

**VÍAS DE MUERTE CELULAR REGULADA ESPECÍFICAS  
GENERADAS AL EXPONER CÉLULAS DE LA LÍNEA THP-1 DE  
MONOCITOS HUMANOS AL CONDENSADO DE VAPEADORES CON  
ESENCIA DE TABACO SIN NICOTINA; MENTOL CON NICOTINA Y  
MENTOL SIN NICOTINA**

**AUTORES: BARBARA MUÑOZ BAACK  
LUCIANO PARADA BARRIENTOS**

**PROFESOR GUÍA: CARLOS JARA GUTIÉRREZ MSc., PhD.  
PROFESOR TUTOR: ANGELO BARTSCH Klg. PhD.**

**Valparaíso-Chile**

**2025**

## Tabla de contenidos

I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	3
II. ABREVIATURAS Y/O SIGLAS.....	3
Capítulo I	3
1.Introducción	4
Capítulo II	5
2. Marco teórico	5
2.1. Tabaquismo	5
2.2. Cigarros electrónicos	6
2.3. Lesión pulmonar asociada al uso de cigarrillos electrónicos o productos de vapeo (EVALI)	7
2.4. Estrés oxidativo	8
2.5. Monocito THP-1 humano	8
2.6. Muerte celular regulada	8
2.7. Piroptosis	9
2.8. Ferroptosis	9
2.9. Muerte dependiente del lisosoma	10
2.10. Necroptosis	10
2.11. Necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (necrosis MPT)	11
Capítulo III	12
3.1. Objetivo general:	12
3.2. Objetivos específicos:	12
3.3. Población	12
3.4. Muestra	13
3.5. Definición de Variables	13
3.6.Tipo de estudio	17
3.7.Técnicas e instrumentos	17
Capítulo IV	19
4.Procedimientos	19
5.Citotoxicidad celular (Denizot F. & Lang R.)	19
6.Análisis estadístico	27
7. Resultados	27
8.DISCUSIÓN	28
9.Conclusión	32
10. Bibliografía	33

## **I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

Tabla N°1: Técnicas e instrumentos.....	13
Tabla N°2: Procedimiento para calcular viabilidad celular.....	17
Tabla N°3. Procedimiento para calcular Viabilidad Celular.....	19
Figura 1. Porcentaje promedio de viabilidad celular en la línea de monocitos THP-1 Humanos y además expuestas a los distintos tratamientos.....	31

## **II. ABREVIATURAS Y/O SIGLAS**

ACD: Muerte Celular Accidentada

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

DAMP: Patrones Moleculares Asociados a Daños

ECNT: Enfermedades Crónicas No Transmisibles

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

EVALI: Enfermedad Pulmonar Asociada al Uso de Vaper o Cigarrillos Electrónicos/E-cigarette or Vaping product use-Associated Lung Injury (En inglés)

GPX4: Glutación Peroxidasa 4

LDCD: Muerte Celular Dependiente de Lisosomas

LMP: Permeabilización de la Membrana Lisosomal

LPS: Lipopolisacáridos Intracelulares

MCN: Mentol con Nicotina

MSN: Mentol sin Nicotina

NF-kB: Nuclear Factor kappa B

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PRR: Receptor de Reconocimiento de patrones

RCD: Muerte Celular Regulada

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno/Reactive Oxygen Species (En inglés)

TCN: Tabaco con Nicotina

THC: Tetrahidrocannabinol

TSN: Tabaco sin Nicotina

REA:Residuos de Establecimientos de Atención de Salud

CIOMS:Council for International Organizations of Medical Sciences

ETC: cadena de transporte de electrones

OXPPOS: fosforilación oxidativa

NHE: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

PMCA: ATPasa cálcica de la membrana plasmática

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

**Anexo 1** Bioética y bioseguridad

**Anexo 2** Análisis estadístico

28

## Resumen

*El crecimiento en el uso de cigarrillos electrónicos ha generado una preocupación creciente por sus efectos adversos en la salud, especialmente en el sistema pulmonar. Aunque se conoce la toxicidad general, los mecanismos citotóxicos específicos, particularmente las vías de muerte celular regulada activadas en células inmunes como los monocitos, permanecen inexplorados. Esta investigación busca identificar la vía de muerte celular inducida por el vapeo.*

Objetivo: Evaluar mediante el uso de inhibidores, las vías de muerte celular regulada que se activan al exponer monocitos humanos (línea THP-1) al condensado de vapeador.

Método: La presente investigación corresponde a un estudio post test cualitativo in vitro con diseño experimental.

La población la conformaron las células THP-1 Humano las cuales fueron expuestas a tratamientos de condensados de tabaco sin nicotina (TSN), tabaco con nicotina (TCN), mentol sin nicotina (MSN), mentol con nicotina (MCN), control solvente (CS) y control positivo (C+). La identificación de las vías de muerte celular regulada se realizará utilizando inhibidores específicos para cada vía, Z-VAD-FMK para Piroptosis, Ferrostatina para Ferroptosis, CA-074M2 para la Muerte Dependiente del Lisosoma, Ciclosporina para la Autofagia y Necrostatina para la Necroptosis.

Para cada muestra se evaluó viabilidad celular.

Resultados: Todos los tratamientos generaron una disminución de la viabilidad celular, sin embargo, no fue posible identificar la vía de muerte celular responsable del aumento de la citotoxicidad, lo que sugiere que otras vías sean objetivo de estudios adicionales a futuro.

Conclusiones: Los resultados de este estudio confirman que todos los condensados de vapeador evaluados reducen la viabilidad de las células THP-1, independientemente de la presencia de nicotina, siendo los sabores tabaco los más citotóxicos. Ninguno de los inhibidores aplicados logró revertir dicha pérdida de viabilidad, lo que sugiere que las vías de muerte celular regulada evaluadas no serían las predominantes en este modelo, indicando que otras vías de muerte regulada pueden estar involucradas o la posible participación de mecanismos alternativos como parthanatos u oxeiptosis. Estos hallazgos refuerzan que los aerosoles de vapeo no son inocuos y pueden alterar de manera importante la función de células inmunes. A futuro, se recomienda profundizar en vías emergentes de muerte celular, incorporar técnicas de análisis más específicas y emplear modelos celulares más complejos que permitan comprender mejor el impacto real de los vapeadores sobre el sistema respiratorio y su potencial relación con patologías como EVALI.

Palabras clave: Vapeador, Esencias, Nicotina, Citotoxicidad, Monocitos THP-1

humano, muerte celular regulada.

## **Abstract**

*The growing use of electronic cigarettes has raised increasing concern about their adverse health effects, particularly on the pulmonary system. Although general toxicity is known, the specific cytotoxic mechanisms—especially the regulated cell death pathways activated in immune cells such as monocytes—remain unexplored. This research aims to identify the cell death pathway induced by vaping.*

**Objective:** To evaluate, through the use of inhibitors, the regulated cell death pathways activated when human monocytes (THP-1 cell line) are exposed to vape condensate.

**Method:** This research corresponds to an in vitro qualitative post-test study with an experimental design.

The population consisted of human THP-1 cells, which were exposed to condensate treatments: tobacco without nicotine (TSN), tobacco with nicotine (TCN), menthol without nicotine (MSN), menthol with nicotine (MCN), solvent control (SC), and positive control (C+). The identification of regulated cell death pathways was carried out using specific inhibitors for each pathway: Z-VAD-FMK for pyroptosis, ferrostatin for ferroptosis, CA-074M2 for lysosome-dependent cell death, cyclosporine for autophagy, and necrostatin for necroptosis.

Cell viability was assessed for each sample.

**Results:** All treatments caused a decrease in cell viability; none of the treatments were able to prevent cytotoxicity to demonstrate a specific cell death pathway.

**Conclusions:** The results of this study confirm that all the vaping condensates evaluated reduced the viability of THP-1 cells, regardless of the presence of nicotine, with tobacco flavors being the most cytotoxic. None of the applied inhibitors reversed this loss of viability, suggesting that the evaluated regulated cell death pathways were not predominant in this model. This indicates that other regulated cell death pathways, or alternative mechanisms such as parthanates or oxeiptosis, may be involved. These findings reinforce the idea that vaping aerosols are not harmless and can significantly alter the function of immune cells. Future research should delve deeper into emerging cell death pathways, incorporate more specific analytical techniques, and employ more complex cell models to better understand the true impact of vaping on the respiratory system and its potential relationship to pathologies such as EVALI.

**Keywords:** Vaping device, Essences, Nicotine, Cytotoxicity, Human THP-1 monocytes, Regulated cell death.

## Capítulo I

### 1.Introducción

El tabaquismo se presenta en la actualidad como una de las amenazas más significativas para la salud pública a nivel mundial ya que, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) ha catalogado el tabaquismo como una enfermedad crónica no transmisible y adictiva. A nivel nacional, también es una problemática de salud pública el tabaquismo dado que Chile posee una de las más altas prevalencias de consumo de tabaco en la Región de las Américas, tanto en adolescentes como en personas adultas (OPS, 2016).

La adicción a la nicotina y las estrategias de marketing de la industria tabacalera perpetúan este problema, mientras que el tabaquismo pasivo afecta también a quienes no fuman y según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024) la exposición al humo de tabaco ajeno también se ha relacionado con consecuencias adversas para la salud, ya que causa 1,2 millones de muertes al año. En suma, agrega que cada año mueren 65.000 niños debido a enfermedades que se provocan debido a la exposición de humo de combustión transformando a estos niños en fumadores pasivos. Además, fumar durante el embarazo puede provocar diversas enfermedades a largo plazo en los bebés, en este contexto, es fundamental abordar el tabaquismo no sólo como un desafío de salud individual, sino como una cuestión de salud pública que requiere intervenciones efectivas y políticas integrales para su control y prevención (Burke et al., 2012).

Muchos fumadores recurren a los cigarrillos electrónicos o vapeadores como una alternativa para dejar el cigarrillo o consumir en menor cantidad, creyendo que son una opción más segura y menos dañina. Sin embargo, los cigarrillos electrónicos también están implicados en la disfunción endotelial, estrés oxidativo en la vasculatura y los pulmones pudiendo ser igual o incluso más perjudicial que el tabaco (Kuntic et al., 2019). Además, debido a la publicidad y fácil acceso, los cigarrillos electrónicos han tenido un crecimiento notable y han originado una nueva generación de usuarios de cigarrillos electrónicos, siendo niños, adolescentes y jóvenes la gran mayoría de estos nuevos usuarios, que previamente no fumaban y ahora son usuarios habituales de estos productos (Borrajo et al., 2023).

Cuando se exponen los monocitos residentes del pulmón al vapor de cigarrillos electrónicos, ocurre un aumento de la toxicidad, una reducción del metabolismo, migración, fagocitosis y reclutamiento de los macrófagos provocando que, el sistema respiratorio tenga una menor respuesta protectora frente a antígenos y seamos más propensos a adquirir una infección o enfermedad respiratoria (Hamon et al., 2024).

En un estudio previo realizado por un grupo de tesis de la Escuela de Kinesiología, dirigidos por la Kinesióloga María Ignacia Grossi y el Dr. Carlos Jara, se evaluó el efecto de los residuos de las esencias de vapedor de mentol con nicotina, mentol sin nicotina; tabaco con nicotina y tabaco sin nicotina sobre parámetros de citotoxicidad, oxidación (ROS), potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi\Delta mt$ ), factores de transcripción antioxidantes (Nrf2 y FOXO3a) y caspasas activas en la línea celular de monocitos THP-1 humanos. Los resultados de esta investigación arrojaron hallazgos como la disminución de la viabilidad celular, concentración dependiente de los condensados del vapeo; un aumento en la producción de ROS en los monocitos una vez expuestos a los condensados; un aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial; un aumento en la expresión de Nrf2 y FOXO3a; y activación de muerte celular regulada asociada a la vía mediada por caspasas sólo en las células que fueron expuestas al condensado de la esencia tabaco con nicotina. El resto de los condensados, tabaco sin nicotina, mentol sin nicotina y mentol con nicotina, generan la muerte celular de forma independiente de la activación de caspasas, por lo que urge reconocer las vías específicas activadas por estos condensados. La finalidad de indagar sobre las vías específicas de muerte celular regulada activadas por estos tres condensados, es de instaurar terapias específicas contra estos mecanismos de muerte para que así el tratamiento sea más eficaz y particular.

Entonces con los antecedentes dados surge la siguiente pregunta ¿Qué vías de muerte celular reguladas específicas están siendo activadas en el monocito humano THP-1, al exponerlos a los condensados de esencia tabaco sin nicotina, mentol con y sin nicotina?

## Capítulo II

### 2. Marco teórico

#### 2.1. Tabaquismo

Se considera al tabaquismo como una enfermedad crónica, acompañado de una inherente dependencia, y en el 80% de los casos inicia el consumo antes de los 18 años, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial por su alta prevalencia, morbilidad y mortalidad (Álvarez et al., 2023). La nicotina es el componente esencial del tabaco que genera adicción, siendo una sustancia psicoactiva que interviene en la cognición, humor y comportamiento de los fumadores. La nicotina tiene un rol como reforzador del uso del tabaco, provocando la conducta de búsqueda y uso de una sustancia (Pozuelos et al, 2000). Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2023, más de 8 millones de personas mueren al año a causa del tabaco alrededor del mundo, incluyendo un estimado de 1.3 millones de personas que no son fumadoras activas, pero están constantemente expuestas a humo de combustión de tabaco, es decir, fumadores pasivos.

El consumo de tabaco es responsable de un deterioro de la calidad de vida, disminución de la función física y envejecimiento precoz, pero lo más preocupante no es la minoración de los años de vida, sino que los años de supervivencia son vividos en peores condiciones de salud (Graud et al., 2007). Paralelamente, los fumadores pasivos también poseen un alto riesgo de padecer efectos adversos significativos en varios sistemas del cuerpo con tan solo un breve periodo de exposición al humo de combustión, de modo que, el cese a la actividad tabáquica no solo beneficia a fumadores activos, sino que también protege la salud de las personas de sus entornos (Flouris et al, 2009).

En cuanto a Chile, las estadísticas extraídas del último informe sobre el control del tabaco en América de la Organización Panamericana de Salud (OPS, 2022), el país sigue con la tasa de prevalencia más alta de consumo de tabaco registrada en adultos de la región en el año 2020 (29,2%), reflejando la mantención de dicho puesto por más de una década y la gran urgencia de tomar medidas adecuadas para enfrentar el tabaquismo en nuestro país.

El tabaquismo tiene una estrecha relación con las Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) dado que se establece como uno de los factores de riesgos más relevantes en este tiempo, contemplando sus efectos a partir de componentes físicos, psicológicos y sociales (Corvalán, 2017). El consumo de cigarrillo aumenta potencialmente las probabilidades de desarrollar enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas (EPOC principalmente), cáncer y diabetes,

principales ECNT y origen de casi dos tercias partes de las defunciones a nivel global (Reynales, 2012).

El aumento del consumo de cigarrillos ha suscitado preocupaciones sobre el desarrollo y el empeoramiento de enfermedades, en particular las relacionadas con las vías respiratorias. El humo del cigarrillo provoca importantes alteraciones estructurales en el epitelio respiratorio, provocando una reducción de la viabilidad celular, inducción de la apoptosis en las células ciliadas respiratorias, engrosamiento de la submucosa, pérdida de la elasticidad e inflamación con infiltración de células inflamatorias tales como neutrófilos y mononucleares (Tamashiro et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el tabaco es capaz de alterar la morfología del pulmón y su correcto funcionamiento, producido por el alto estrés oxidativo impuesto por las ROS que se producen por acción directa del humo del cigarro (Gutiérrez, 2003). Dado esto, cada vez la concientización y educación con respecto a la gran cantidad de riesgos que posee el tabaco tradicional ha elevado el impacto en la búsqueda de alternativas menos “dañinas” por parte de los fumadores, teniendo en consideración una opción controversial que posee una popularidad en aumento, el uso de cigarrillos electrónicos.

## **2.2. Cigarros electrónicos**

El cigarrillo electrónico es un dispositivo alimentado por una batería recargable que contiene un mecanismo que funciona calentando un cartucho que libera dosis de vapor de diferentes esencias que pueden o no contener nicotina. El mecanismo se activa mediante la inhalación sin mediar combustión, por lo que no produce humo (Córdoba, 2014). Los cartuchos y soluciones de estos cigarrillos contienen nitrosaminas, dietilenglicol, otros contaminantes que producen un aumento de ROS lo que es potencialmente dañino para el sistema respiratorio (Palazzolo, 2013).

El cigarro electrónico se ha utilizado principalmente como una alternativa para dejar el tabaco porque supuestamente es menos dañino pero, según Marques et al. (2021) el consumo de cigarros electrónicos puede causar daños perjudiciales para la salud tanto en el sistema cardiovascular como en el sistema respiratorio ya que, la exposición al aerosol de cigarrillo electrónico aumenta la expresión de marcadores inflamatorios como la activación de neutrófilos, leucocitos y plaquetas lo que estaría directamente relacionado con un incremento del estrés oxidativo, daño endotelial microvascular, alteraciones en la función endotelial, cambios del tono en la musculatura lisa de la garganta, por lo que el consumo de cigarrillos electrónicos está vinculado a toxicidad, estrés oxidativo e inflamación.

### **2.3. Lesión pulmonar asociada al uso de cigarrillos electrónicos o productos de vapeo (EVALI)**

EVALI es una enfermedad Pulmonar Asociada al Uso de Vapper o Cigarrillos Electrónicos, (por sus siglas en inglés E-cigarette or Vaping product use-Associated Lung Injury), que emergió como una entidad clínica reconocida en 2019 en los Estados Unidos, cuando se reportaron demasiados nuevos casos de daño pulmonar grave, principalmente entre adultos jóvenes y adolescentes. Los pacientes con EVALI suelen presentar síntomas como tos, disnea, dolor torácico, náuseas, vómitos, fiebre, pérdida de peso y fatiga generalizada, lo que en la mayoría de los casos requieren de hospitalización y soporte ventilatorio (Layden et al., 2020). Aunque inicialmente se pensaba que la nicotina era el principal agente etiológico, las investigaciones señalaron al acetato de vitamina E, como un probable responsable del daño pulmonar, el cual, es usado para diluir líquidos que contienen tetrahidrocannabinol (THC) (Blount et al., 2020). A nivel patológico, se han descrito patrones de daño alveolar difuso, neumonía organizada y lesiones lipídicas en el pulmón, sugiriendo una respuesta inflamatoria intensa a nivel pulmonar y sistémico (Mukhopadhyay et al., 2020). A nivel histopatológico, los estudios revelan un patrón de daño alveolar agudo, con presencia de macrófagos cargados de lípidos, lo cual respalda que el uso de vappers genera un efecto nocivo a nivel pulmonar, provocado por la inhalación de aceites, que están contenidos en las diferentes esencias para los vappers (Butt et al., 2019). El brote de EVALI puso en evidencia la falta de regulación en la composición de los líquidos de vapeo, particularmente en los productos obtenidos de fuentes informales o ilegales, lo cual subraya la importancia de políticas de salud pública orientadas al control de estos dispositivos y de conocer que vías son las involucradas en el daño generadas por el consumo de estas sustancias (CDC, 2020).

En un estudio sobre pacientes con EVALI, se evidencia un notorio incremento en biomarcadores de estrés oxidativo, con niveles urinarios elevados tanto de 8-isoprostano (marcador de peroxidación lipídica) como de 8-OHdG (indicador de daño oxidativo al ADN), en comparación con personas que no usan vapeadores, esto demuestra que el estrés oxidativo es un mecanismo central en la patogenia de la EVALI, reflejando un desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes que contribuye a la inflamación pulmonar y el daño tisular característicos de la enfermedad (Podguski et al. , 2022).

## 2.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es considerado un desbalance entre la cantidad de oxidantes y antioxidantes, producto de un aumento de agentes oxidantes o una disminución de antioxidantes. Es sabido que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades, presentando una mayor concentración de ROS, por ejemplo, a nivel pulmonar. De hecho, la presencia elevada de ROS induce efectos nocivos que modifican el adecuado desempeño pulmonar, tales como la inactivación de antiproteasas, la lesión de tejido epitelial de la vía aérea, el aumento del secuestro de neutrófilos en la microvasculatura pulmonar y la expresión génica de mediadores proinflamatorios, como el factor nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), que regula los genes para mediadores proinflamatorios y la expresión génica antioxidante protectora (MacNee, 2000).

Dicho lo anterior, se ha evidenciado los efectos negativos que se provoca a partir del desequilibrio oxidativo generado por el uso de cigarrillos electrónicos. En consecuencia, se desarrolla un ambiente dañino para los pulmones y las células que residen en esa región. A nivel celular, se ha evaluado el comportamiento de los monocitos THP-1 en respuesta al consumo de cigarrillos electrónicos, demostrando que el estrés oxidativo, efecto proinflamatorio y presencia de nicotina son causantes de un ambiente citotóxico para el THP-1 y, en consecuencia, la muerte celular (Ma et al., 2020).

## 2.5. Monocito THP-1 humano

Los monocitos y macrófagos pertenecen al compartimento inmune innato, en el que sus principales funciones son (1) el reconocimiento de patógenos extraños como bacterias, hongos y virus a través de la interacción de sus estructuras superficiales con diferentes tipos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR); (2) la proliferación para aumentar la cantidad de células que son capaces de eliminar patógenos; (3) la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias y; (4) fagocitosis para engullir y digerir patógenos. Por consiguiente, se ha utilizado el modelo THP-1 que pertenece a una línea celular monocítica de leucemia humana para estudiar las funciones, los mecanismos, las vías de señalización y el transporte de nutrientes y fármacos de monocitos/macrófagos (Chanput et al., 2014).

La línea monocito THP-1 humano es un modelo que se puede diferenciar en macrófagos derivados de monocitos y son ocupados principalmente en estudios que involucran inflamación y cáncer, porque este modelo no produce respuestas inmunitarias perjudiciales *in vivo* siendo así, una alternativa viable para estudios en macrófagos o que los involucren (Zahidah et al., 2022).

## 2.6. Muerte celular regulada

Como todo ser vivo, las células también poseen un proceso que marca el final de su vida catalogadas de dos maneras. La primera es la muerte celular accidental (ACD), producto de un suceso biológicamente sin control de origen físico (p. ej., calor extremo del ambiente extracelular), químico (p. ej., cambios drásticos y dañinos del pH) o mecánico (p. ej., lesiones traumáticas). Por otro lado, la segunda alternativa es la muerte celular regulada (RCD) que se caracteriza por un mecanismo que contempla una cascada de reacciones químicas como solución adaptativa frente al estrés celular con el fin de preservar una homeostasis del organismo y, por otra parte, es capaz de aportar en el desarrollo y/o remodelación de tejidos. Con lo anteriormente mencionado, es fundamental tener en cuenta que es un proceso que no solo demuestra la capacidad de nuestros sistemas en reconocer y eliminar las células defectuosas, sino también la utilización de moléculas por parte de las células dañadas en alertar a nuestro organismo acerca de futuros riesgos potenciales (Galluzzi et al. 2018).

Según lo publicado por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (2018), existen 12 tipos de RCD, entre las cuales se encuentran la apoptosis intrínseca, la apoptosis extrínseca, la necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (necrosis MPT), la necroptosis, la ferroptosis, la piroptosis, parthanatos, la muerte celular entóxica, la muerte celular NETóxica, la muerte dependiente del lisosoma, la muerte dependiente de autofagia y la muerte celular inmunogénica. Cada uno de estos tipos de RCD está mediada por un conjunto de biomoléculas específicas que, de manera sinérgica, activan las vías que finalizan en una muerte limpia y sin afectar a las células sanas colindantes (Galluzzi et al. 2018).

Producto de la investigación previa, sabemos que los condensados de vapor de esencia de tabaco sin nicotina, mentol con nicotina y sin nicotina son citotóxicos, generan pérdida del potencial de membrana mitocondrial, ROS, activación de factores de transcripción vinculados a defensas antioxidantes, pero sin activar caspasas. Por ende, a continuación, explicaremos algunas de las vías que en su cascada de señalización poseen estas características y que corresponden a las posibles RCD activadas por los condensados mencionados.

## 2.7. Piroptosis

La piroptosis se compone de "piro" y "ptosis". "Piro" significa fuego, lo que indica las propiedades de inflamación de la piroptosis, pero "ptosis" significa caída, lo que es consistente con otras formas de muerte celular reguladas. Existen algunas similitudes entre la piroptosis y la apoptosis, como el daño al ADN y la condensación de la cromatina, pero en general, se cree que la apoptosis es una forma segura de muerte, pero la piroptosis puede causar inflamación, activada por la estimulación extracelular o intracelular, como los medicamentos bacterianos, virales, tóxicos y de quimioterapia (Yu et al., 2021).

La piroptosis es una forma de muerte celular regulada con un fuerte componente inflamatorio, el aumento de ROS y la disfunción mitocondrial, que juega un papel crucial en la defensa contra infecciones, pero también puede estar implicada en una serie de enfermedades inflamatorias si no se regula adecuadamente. Al involucrar tanto la activación de inflamasomas como la liberación de citoquinas inflamatorias, la piroptosis no solo elimina células infectadas, sino que amplifica la respuesta inmune, mediadas por proteínas gasderminas (familia de proteínas formadoras de poros), las cuales provocan la hinchazón celular, la ruptura de la membrana y la liberación del contenido celular. La gasdermina D (GsdmD) posee vías de activación canónicas y no canónicas, la vía canónica puede ser activada tras una infección microbiana respondiendo a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y a los patrones moleculares asociados a daños (DAMP), y la vía no canónica responde a los lipopolisacáridos intracelulares (LPS) de las bacterias gramnegativas (Dai et al., 2023).

## **2.8. Ferroptosis**

La ferroptosis es uno de los procesos de muerte celular regulada caracterizada por una peroxidación lipídica y elevadas concentraciones de hierro en el transcurso de este mecanismo. Se ha establecido que para inducir este tipo de muerte es necesario contar con la presencia de hierro y que, a su vez, se estén desarrollando una cascada de reacciones que difieren, al menos, morfológicamente otros tipos de muerte como, por ejemplo, la ausencia de formación de cuerpos apoptóticos y desintegración del citoesqueleto. Por consiguiente, algunos factores con la capacidad de generar ferroptosis, pueden alterar de forma directa o indirecta la actividad de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4), dando lugar a una acción antioxidante disminuida y, en consecuencia, un aumento de ROS en el espacio intracelular, provocando la muerte celular oxidativa. Por otro lado, se ha descrito la actividad de la erastina, un compuesto inductor de ferroptosis con un alto efecto selectivo letal en las células tumorales, independiente de la activación de caspasas (Li et al., 2020).

## **2.9. Muerte dependiente del lisosoma**

La muerte celular dependiente de lisosomas (LDCD) es relevante para varios escenarios en la fisiopatología, siendo parte de procesos como la inflamación, remodelación y reestructuración de tejidos, envejecimiento, neurodegeneración, patologías relacionadas al sistema cardiovascular y respuestas a agentes

infecciosos, como bacterias capaces de establecerse en el espacio intracelular. El mecanismo de acción de la LDCD inicia con la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP), generando una liberación al citoplasma de diferentes elementos que se encuentran dentro del lisosoma, como enzimas pertenecientes a la familia de las catepsinas, conocidas por su acción proteolítica. Las catepsinas normalmente aceleran la muerte celular producto de su capacidad catalizadora, interviniendo en la activación o inactivación de varias enzimas con funciones proteolíticas, incluidos BID y BAX, que forman parte de la familia BCL2 proapoptóticos, por ende, se genera una cadena de reacciones, mediante un feedback positivo, con el objetivo de promover la muerte, involucrando, algunas veces la participación de caspasas inflamatorias. En algunas ocasiones, es posible que se presente una disfunción lisosomal primaria, impactando en la actividad autofágica en respuesta a la aparición de mitocondrias con un daño considerable (disfuncionales o con pérdida del potencial de membrana), aumentando la producción de ROS y alterando el proceso de degradación. Por otro lado, se han documentado varios factores que podrían inducir esta vía de muerte celular como, por ejemplo, la presencia de ROS que favorecen la actividad de canales sensibles a calcio y generan sin problemas una LMP, aunque las observaciones sugieren que existe una relación entre la generación de ROS en el ambiente celular y las respuestas adaptativas al estrés, a modo que, la LMP y LDCD se verían estrechamente condicionadas por los factores antes mencionados (Galluzzi et al., 2018).

## **2.10. Necroptosis**

La necroptosis es una forma de muerte celular regulada que presenta características morfológicas similares a la necrosis, pero que ocurre bajo un control molecular preciso. Este proceso se inicia principalmente mediante la interacción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) con su receptor TNFR1, lo que conduce a la formación del complejo I, que incluye proteínas como TRADD, TRAF2, RIPK1, cIAPs y LUBAC (Zhou & Yuan, 2014). Una vez activados los receptores con dominio de muerte, la quinasa RIPK1 se activa y la caspasa-8 es inhibida, se forma el complejo IIb, involucrando a RIPK1, FADD y caspasa-8 inhibida, favoreciendo la necroptosis. Por otro lado, en ausencia de caspasa-8 activa, RIPK1 y RIPK3 interactúan para formar el necrosoma, promoviendo la fosforilación de la proteína pseudiquinasa MLKL (Sun et al., 2012). Una vez activada, MLKL se oligomeriza y se transloca a la membrana plasmática, donde induce la pérdida de integridad de la membrana y la liberación de DAMPs, desencadenando una respuesta inflamatoria (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). La necroptosis ha sido implicada en múltiples patologías como enfermedades neurodegenerativas, cáncer e infecciones virales, y representa una diana terapéutica prometedora para modular la inflamación y la respuesta inmune.

## 2.11. Necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (necrosis MPT)

La necrosis dependiente del MPT, es causada por el aumento de la permeabilidad mitocondrial producto de la apertura del poro de transición mitocondrial, el cual corresponde a un canal no selectivo de alta conductancia ubicado en la membrana interna mitocondrial, que permite el paso de solutos de hasta 1.5 kDa. Este proceso provoca la pérdida del potencial de membrana, la hinchazón de la matriz mitocondrial, la ruptura de la membrana externa y la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c. Este mecanismo es promovido por el aumento de calcio intracelular, el estrés oxidativo, procesos de isquemia-reperfusión, lo que lleva al aumento en la expresión de la proteína ciclofilina D (CyPD) que altera la permeabilidad del poro, generando depleción de ATP y finalmente a la necrosis celular (Robichaux et al., 2023).

La apertura del poro de transición mitocondrial forma parte de medidas fisiológicas que contribuyen a una serie de procesos como, la regulación de la bioenergética mitocondrial, el metabolismo celular, normalizar niveles de  $Ca^{2+}$ , mantener la homeostasis y producción de ROS. Por otra parte, la CyPD es una proteína mitocondrial clave en la regulación del poro de transición mitocondrial (MPT). Su relevancia radica en que, al modular la apertura del MPT, CyPD controla las especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la mitocondria, por lo que la apertura prolongada de este canal es considerada patológica y puede conducir a la alteración del metabolismo mitocondrial y una desregulación osmótica del organelo, provocando hinchazón mitocondrial y la ruptura de la membrana externa, la cual es la causa principal de la liberación de citocromo c hacia el citosol, lo que inicia la muerte celular (Bernardi et al., 2023). Por otro parte, la falta de oxigenación se traduce en una reducción de la actividad de la cadena de transporte de electrones (ETC) y, por lo tanto, da lugar al bloqueo de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y, a la consiguiente reducción del reciclaje de ATP, en este escenario, para satisfacer las demandas de energía, las células regulan al alza la glucólisis anaeróbica, produciendo ácido láctico e iones de hidrógeno, lo que da lugar a la acidosis intracelular, al neutralizar el pH a través de la activación del antiportador de  $Na^+/H^+$  (NHE), la célula experimenta una acumulación de sodio que se contrarresta con la actividad inversa del intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), concomitantemente, la reducción del ATP disponible deprime la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , la ATPasa cálcica de la membrana plasmática (PMCA) y la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco-/endoplásmico (SERCA), lo que en última instancia resulta en una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  citosólico, además, la  $pO_2$  reducida provoca la acumulación de electrones entre diferentes complejos respiratorios, lo que conduce a la producción de ROS, favoreciendo su acumulación e inducción de MPT (Bonora et al., 2020).

Conocer las vías involucradas en el daño generado por los condensados de vapor, permite idear estrategias para tratar los problemas causados por el uso de estos dispositivos. Por lo anterior, la pregunta de investigación de la presente tesis es ¿Qué vías de muerte celular reguladas específicas están siendo activadas en el

monocito humano THP-1, al exponerlos a los condensados de esencia tabaco sin nicotina, mentol con y sin nicotina?

## **Capítulo III**

### **3. Metodología**

#### **3.1. Objetivo general:**

- Evaluar a través de inhibidores, las vías de muerte celular regulada (RCD) que se activan al exponer monocito humano (línea THP-1) al condensado de vapeador.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

1. Determinar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a vías dependientes de caspasas usando el inhibidor Z-VAD-FMK.

2. Identificar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a ferroptosis usando el inhibidor Ferrostatina.
3. Establecer si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a muerte que depende del lisosoma usando el inhibidor CA-074M2.
4. Demostrar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (necrosis MPT) usando el inhibidor ciclosporina A.
5. Definir si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a necroptosis usando el inhibidor necrostatina.

### 3.3. Población

- Universo: Células monocitos humanos inmortalizados residentes del tracto respiratorio.
- Población: Células de Monocitos THP-1 Humanos.

### 3.4. Muestra

- Las muestras son células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a tratamientos de condensados de tabaco sin nicotina (TSN), tabaco con nicotina (TCN), mentol sin nicotina (MSN), mentol con nicotina (MCN), control solvente (CS) y control positivo (C+).

### 3.5. Definición de Variables

En esta tabla N°1 se listarán las variables de la investigación y sus definiciones correspondientes.

**Tabla N°1 de variables**

<u>Variable</u>	<u>Definición</u>	<u>Unidad de medida</u>
Independiente	Tratamientos: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>C+</b>: Células con inductor de muerte Triton (20%)</li> <li>- <b>Control Solvente</b>: Células con DMSO (2%)</li> <li>- <b>TSN</b>: Células de Monocitos THP-1</li> </ul>	cell/mL

	<p>Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>TSN+ inhibidor Z-VAD-FMK:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina y el inhibidor de la vía de muerte dependiente de caspasas</li> <li>- <b>TSN+ inhibidor Ferrostatina:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte ferroptosis</li> <li>- <b>TSN+ inhibidor CA-074M2:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte dependiente del lisosoma</li> <li>● <b>TSN+ inhibidor ciclosporina A:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial</li> <li>● <b>TSN+ inhibidor necrostatina:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necroptosis.</li> <li>● <b>TCN:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensados de tabaco con nicotina</li> <li>● <b>TCN+ inhibidor Z-VAD-FMK:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor de la vía de muerte</li> </ul>	
--	--	--

	<p>dependiente de caspasas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>TCN+ inhibidor Ferrostatina:</b> - Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte ferroptosis.</li> <li>● <b>TCN+ inhibidor CA-074M2:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte dependiente del lisosoma</li> <li>● <b>TCN+ inhibidor ciclosporina A:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial</li> <li>● <b>TCN+ inhibidor necrostatina:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necroptosis.</li> <li>● <b>MSN:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensados de mentol sin nicotina</li> <li>● <b>MSN+ inhibidor Z-VAD-FMK:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol sin nicotina y el inhibidor de la vía de muerte dependiente de caspasas</li> <li>● <b>MSN+ inhibidor Ferrostatina:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte ferroptosis.</li> </ul>	
--	--	--

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>MSN+ inhibidor CA-074M2:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte dependiente del lisosoma</li>   <li><b>MSN+ inhibidor ciclosporina A:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial</li>   <li>● <b>MSN+ inhibidor necrostatina:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necroptosis.</li>   <li>● <b>MCN:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensados de mentol con nicotina</li>   <li>● <b>MCN+ inhibidor Z-VAD-FMK:</b>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol con nicotina y el inhibidor de la vía de muerte dependiente de caspasas</li>   <li>● <b>MCN+ inhibidor Ferrostatina:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte ferroptosis.</li>   <li>● <b>MCN+ inhibidor CA-074M2:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte dependiente del lisosoma</li>   <li><b>MCN+ inhibidor ciclosporina A:</b></li> </ul>	
--	--	--

	<p>Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>MCN+ inhibidor necrostatina:</b> Células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensado de mentol con nicotina con el inhibidor de la vía de muerte necroptosis. Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK</li> </ul>	
Dependiente	Citotoxicidad celular (%)	Absorbancia % de viabilidad

### 3.6. Tipo de estudio

- Esta investigación corresponde a un estudio cuasiexperimental *in vitro*.

### 3.7. Técnicas e instrumentos

- La fase inicial del proceso es recolectar los condensados de esencias de tabaco sin nicotina, mentol sin nicotina y mentol con nicotina mediante el vaporizador “Smok vape pen V2”.

Luego se evalúa la viabilidad celular mediante la prueba de MTT, una vez conseguido los resultados de viabilidad, se determina el mecanismo de muerte celular:

1. Utilizando el inhibidor Z-VAD-FMK para la muerte por pyroptosis.
2. Utilizando el inhibidor Ferrostatina para la muerte por ferroptosis.
3. Utilizando el inhibidor CA-074M2 para la muerte que depende del lisosoma.
4. Utilizando el inhibidor ciclosporina para la muerte por necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial.
5. Utilizando el inhibidor necrostatina para la muerte por necroptosis.

Los procedimientos anteriores se llevaron a cabo con los instrumentos expuestos en la **Tabla N°2** donde se menciona la operacionalización de cada implemento. En esta tabla se listarán los implementos utilizados en la investigación, además de sus características técnicas.

**Tabla N°2. Técnicas e instrumentos.**

Implemento	Operacionalización (Características técnicas)
Vaporizador “ <i>Smok vape pen V2</i> ” Esencias de vaporizador, sabor mentol c/nicotina, sabor mentol s/nicotina, tabaco s/nicotina, tabaco c/nicotina.	Mecanismo por el cual se combustionan las esencias para obtener los condensados.
Ambú.	Asimila el pulmón a volumen corriente (500mL).
Micropipetas.	Gradúan las dosis de condensados y activos en el tratamiento de las células.
Puntas graduadas para micropipetas.	Permiten verter los activos en el medio celular.
Tubos Eppendorf.	Implemento utilizado para preservar condensados y activos.
Placas de 96 pocillos	Reservorio de las células antes, durante y posterior al tratamiento.
Incubadora.	Lugar donde se preservan las células ya que tiene las condiciones suficientes como la temperatura a 37°C y una presión de CO2 de 5%.
Campana de flujo laminar.	Lugar donde se puede dar tratamiento a las células sin tener riesgo que estas se contaminen con microorganismos.
Balanza Analítica.	Permite medir de manera exacta los solutos.
Espátula.	Sirve para verter concentraciones pequeñas de solutos.

Vórtex.	Mezcla la solución mediante vibración.
Sonicador.	Mezcla la solución con ondas de sonido.
Tubos falcón.	Sirve para trasladar las muestras sin riesgos de derrame.
Centrífuga para tubos falcón.	Permite la precipitación del pellet,
Lector de placas <i>ELISA</i>	Mide viabilidad celular

## Capítulo IV

### **4. Procedimientos**

Recolección de condensado. La condensación es el proceso por el cual se obtiene la muestra líquida de cada esencia luego de vaporizarla con el dispositivo “Vape Pen V2”. Se utiliza un ambú, el cual tiene la función de imitar al sistema respiratorio, dado que emula el volumen tidal o corriente de una persona (500 mL). El tiempo de combustión es de 8 segundos, con el regulador de paso de aire del vaporizador a máxima capacidad, lo que se considera una vapeada.

Luego de realizar la vapeada se deja condensar por 10 minutos a -20 °C, este proceso se repite 3 veces, después se agrupan las microgotas las cuales al formar una gota de 100 µL aproximadamente se recoge con una micropipeta P200, esto se recolecta en un tubo Eppendorf hasta conseguir 1 mL.

Al cambiar cada esencia, se cambió a su vez el vidrio y la resistencia del vaporizador; además los ambúes se lavaron con agua destilada y jabón, esto con el objetivo de que no se mezclaran los condensados. Según el cálculo realizado por

los investigadores de esta tesis se estima que por cada 3 vapeadas se recolectan 100 µL de condensados de las esencias de vapeador.

### **5.Citotoxicidad celular (Denizot F. & Lang R.)**

El protocolo para evaluar el porcentaje de citotoxicidad celular se realiza mediante la técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), que requiere uso de placas de cultivo celular que poseen 96 pocillos de 100µL de medio celular DMEM, con una cifra mínima de 5.000 y máxima de 10.000 células de monocitos THP-1 por pocillo. Posteriormente estos elementos serán ubicados en una incubadora con una temperatura de 37 °C y con una presión regulada de 5,6% de CO<sub>2</sub>.

Esta técnica de MTT corresponde a un ensayo colorimétrico, que utiliza una sal de tetrazolio de color amarillo, que es reducida por enzimas mitocondriales de células vivas a un compuesto insoluble de color púrpura llamado formazán, lo que permite diferenciar células viables de las muertas, ya que, estas últimas no producen dicho cambio de color a purpura. Además, la intensidad del púrpura generado es proporcional a la actividad metabólica y cantidad de células vivas presentes, permitiendo medir citotoxicidad, proliferación y activación celular con alta precisión mediante un lector ELISA (Denizot & Lang, 1986).

El método es sensible, económico y aplicable tanto a células adherentes como en suspensión; sin embargo, puede verse afectado por compuestos que alteren el metabolismo celular, por lo que se recomienda el uso de controles adecuados y, cuando sea necesario, complementarlo con otros ensayos que identifiquen el tipo de muerte celular (Kumar et al.,2018).

El procedimiento se detalla a continuación en la **Tabla N°3**.

#### **Tabla N°3. Procedimiento para calcular Viabilidad Celular.**

Se detalla el procedimiento de viabilidad celular, considerando el número de la muestra, el nombre, el condensado, concentración y cantidad de pocillos.

Número	Nombre	Condensado	Concentración	Cantidad de pocillos
1	Control Solvente	-	2	8
2	Control positivo	Tritón 20%	20 µL	8

3	TSN	Condensado tabaco sin nicotina (TSN)	10 µL	4
4	TSN	Condensado tabaco sin nicotina (TSN)	10 µL	4
5	TSN	Condensado tabaco sin nicotina (TSN)	10 µL	4
6	TSN	Condensado tabaco sin nicotina (TSN)	10 µL	4
7	TSN	Condensado tabaco sin nicotina (TSN)	10 µL	4
8	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
9	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
10	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
11	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
12	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
13	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
14	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
15	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
16	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
17	TSN	Condensado de	10 µL	4

		tabaco sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina		
18	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
19	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
20	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
21	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
22	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
23	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
24	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
25	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
26	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
27	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
28	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
29	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina	10 µL	4

		con el inhibidor necrostatina		
30	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
31	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
32	TSN	Condensado de tabaco sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
33	TCN	Condensado de tabaco con nicotina (TCN)	10 µL	4
34	TCN	Condensado de tabaco con nicotina (TCN)	10 µL	4
35	TCN	Condensado de tabaco con nicotina (TCN)	10 µL	4
36	TCN	Condensado de tabaco con nicotina (TCN)	10 µL	4
37	TCN	Condensado de tabaco con nicotina (TCN)	10 µL	4
38	TCN	Condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
39	TCN	Condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
40	TCN	Condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
41	TCN	Condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
42	TCN	Condensado de tabaco con nicotina y el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
43	TCN	Condensado de	10 µL	4

		tabaco con nicotina con el inhibidor Ferrostatina		
44	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
45	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
46	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
47	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
48	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
49	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
50	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
51	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
52	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
53	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
54	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
55	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor	10 µL	4

		ciclosporina		
56	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
57	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
58	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
59	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
60	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
61	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
62	TCN	Condensado de tabaco con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
63	MSN	Condensado de mentol sin nicotina (MSN)	10 µL	4
64	MSN	Condensado de mentol sin nicotina (MSN)	10 µL	4
65	MSN	Condensado de mentol sin nicotina (MSN)	10 µL	4
66	MSN	Condensado de mentol sin nicotina (MSN)	10 µL	4
67	MSN	Condensado de mentol sin nicotina (MSN)	10 µL	4
68	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
69	MSN	Condensado de mentol sin nicotina	10 µL	4

		con el inhibidor Z-VAD-FMK		
70	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
71	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
72	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
73	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
74	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
75	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
76	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
77	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
78	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
79	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
80	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
81	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4

82	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 $\mu$ L	4
83	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 $\mu$ L	4
84	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 $\mu$ L	4
85	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 $\mu$ L	4
86	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 $\mu$ L	4
87	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 $\mu$ L	4
88	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 $\mu$ L	4
89	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 $\mu$ L	4
90	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 $\mu$ L	4
91	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 $\mu$ L	4
92	MSN	Condensado de mentol sin nicotina con el inhibidor necrostatina	10 $\mu$ L	4
93	MCN	Condensado de mentol con nicotina (MCN)	10 $\mu$ L	4
94	MCN	Condensado de mentol con nicotina (MCN)	10 $\mu$ L	4

95	MCN	Condensado de mentol con nicotina (MCN)	10 µL	4
96	MCN	Condensado de mentol con nicotina (MCN)	10 µL	4
97	MCN	Condensado de mentol con nicotina (MCN)	10 µL	4
98	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
99	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
100	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
101	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
102	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Z-VAD-FMK	10 µL	4
103	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
104	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
105	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
106	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
107	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor Ferrostatina	10 µL	4
108	MCN	Condensado de	10 µL	4

		mentol con nicotina con el inhibidor CA-074M2		
109	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
110	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
112	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
113	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor CA-074M2	10 µL	4
114	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
115	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
116	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
117	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
118	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor ciclosporina	10 µL	4
119	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
120	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
121	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor	10 µL	4

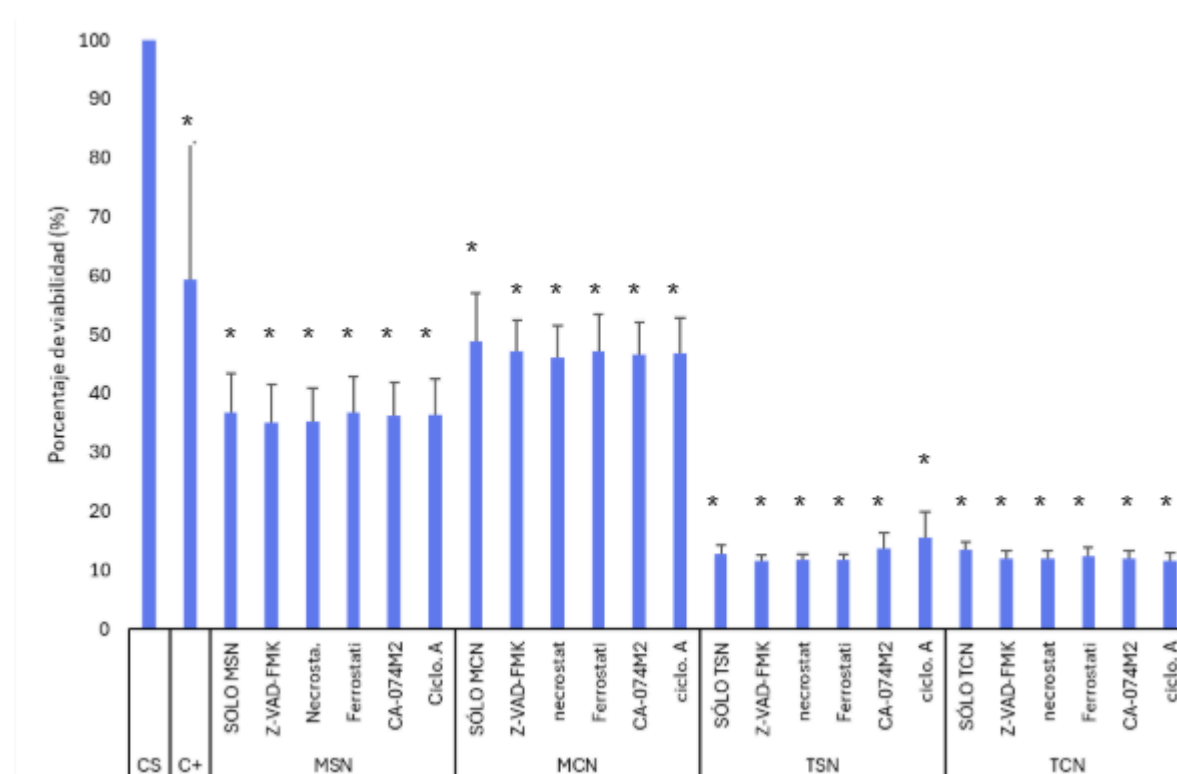
		necrostatina		
122	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4
123	MCN	Condensado de mentol con nicotina con el inhibidor necrostatina	10 µL	4

### **6.Análisis estadístico**

Al realizar prueba de distribución de los datos (chi-cuadrado), identificamos que nuestros resultados son no paramétricos, por lo que realizamos la prueba Anova Kruskal Wallis. Los datos fueron evaluados con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados serán entregados en gráficos que incluyen el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

## 7. Resultados

Los resultados del presente estudio nos revelan que no tenemos certeza de la posible vía de muerte celular, ya que, ningún tratamiento logro mantener intacta su viabilidad celular, por el contrario, todos los tratamientos presentaron una disminución de la viabilidad celular, lo esperado era que si el inhibidor evitaba la muerte celular podríamos saber el mecanismo de muerte celular.



**Figura 1.** Porcentaje promedio de viabilidad celular de la línea de monocitos THP-1 humanas expuestas a distintos tratamientos como se especifica a continuación. CS=Control solvente, C+= Control positivo, MSN= Mentol sin nicotina, MCN=Mentol con nicotina, TSN= tabaco sin nicotina, TCN=Tabaco con nicotina, Z-VAD-FMK para la muerte por pyroptosis, Ferrostatina para la muerte por ferroptosis, CA-074M2 para la muerte que depende del lisosoma, ciclosporina A para la muerte por necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial, necrostatina para la muerte por necroptosis.

Los datos se entregan en promedio  $\pm$  la desviación estándar (n=9), el símbolo \* significa diferencias significativas con respecto al control solvente (CS),  $p < 0,05$ .

En la **figura 1** se muestra la viabilidad celular de las células de monocitos THP-1 las cuales fueron expuestas a los tratamientos de condensados de vapor de mentol sin nicotina (MSN), mentol con nicotina (MCN), tabaco con nicotina (TCN) y tabaco sin nicotina (TSN), junto con los inhibidores Z-VAD-FMK, Ferrostatina, CA-074M2, ciclosporina y necrostatina. En esta figura podemos destacar que los tratamientos de tabaco sin nicotina y tabaco con nicotina muestran un menor porcentaje de

viabilidad en comparación con el mentol con nicotina y el mentol sin nicotina, ningún tratamiento presenta una viabilidad como el control solvente.

## **8. Discusión**

Este estudio se planteó a partir de antecedentes en los cuales se observó que diferentes tipos de condensados (tabaco con nicotina, tabaco sin nicotina, mentol con nicotina y sin nicotina) provocan citotoxicidad en el monocito THP-1, llevando a una disminución en la viabilidad celular, un aumento significativo de ROS y pérdida del potencial de membrana. Cabe destacar que en dicha investigación solo el condensado de tabaco con nicotina induce muerte celular mediada por caspasas, lo que sugiere la activación de vías apoptóticas clásicas. En contraste, en ese mismo trabajo se reportó que los otros tipos de condensados evaluados no activaron las vías dependientes de caspasas, lo que plantea la posibilidad de que dichos tratamientos desencadenan mecanismos alternativos de muerte celular regulada (Forján y Villaseca, 2022 pp. 37-48).

La presente tesis, tuvo como fin evaluar a través de diferentes inhibidores, las vías de muerte celular regulada (RCD) que se activan al exponer monocito humano (línea THP-1) al condensado de vapeador. En particular, se buscó esclarecer qué mecanismos de muerte celular se inducen ante la exposición a condensados de mentol con nicotina, mentol sin nicotina, tabaco sin nicotina y tabaco con nicotina. Para ello, fueron seleccionadas 5 vías de muerte relacionadas al aumento de ROS y pérdida de potencial de membrana, en la cual utilizamos inhibidores para identificar la vía de muerte celular como, el inhibidor Z-VAD-FMK para las vías dependientes de caspasas, el inhibidor Ferrostatina para la vía por ferroptosis, el inhibidor CA-074M2 para la vía de muerte que depende del lisosoma, el inhibidor ciclosporina A para la vía de muerte por necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (necrosis MPT) y el inhibidor necrostatina para la vía de muerte necroptosis.

De acuerdo con lo planteado anteriormente, los inhibidores seleccionados bloquean las vías de muerte celular que, según lo esperado en este estudio, se inducen en los monocitos tras la exposición a los condensados. En primer lugar, Z-VAD-FMK actúa como un inhibidor pan-caspasa irreversible, bloqueando la actividad de caspasas ejecutoras e iniciadoras y, con ello, las respuestas dependientes de caspasas, como la apoptosis (Mills et al., 2021; Peter & Thornberry, 2005). En segundo lugar, Ferrostatina-1 (Fer-1) actúa como un atrapador de radicales lipídicos (*RTA*), previniendo la peroxidación lipídica y suprimiendo así la ferroptosis (Dixon et al., 2012; Skouta et al., 2014). En tercer lugar, CA-074 (y su derivado CA-074Me) inhibe la catepsina B lisosomal, evitando la liberación de proteasas al citosol tras la permeabilización lisosomal y bloqueando la muerte celular asociada a este proceso (Mihalik et al., 2004; Xie et al., 2023). Por otro lado, Ciclosporina A impide la

apertura del poro de transición mitocondrial mediante la inhibición de la ciclofilina D, preservando la función mitocondrial y previniendo la necrosis dependiente de MP (Baines et al., 2005; Halestrap et al., 2004). Finalmente, Necrostatina-1 bloquea la cinasa RIPK1, interfiriendo con la formación del complejo necrosómico RIPK1–RIPK3–MLKL e inhibiendo la necroptosis regulada (Degterev et al., 2005; Wu et al., 2021). En conjunto, el uso de estos inhibidores permitió abordar de manera diferencial los mecanismos implicados en la respuesta citotóxica de las células THP-1 frente a los condensados de vapeador y así evaluar la viabilidad celular con el fin de identificar las muertes relacionadas a cada tipo de condensado.

En el presente trabajo, se realizó una exposición celular mediante la utilización de condensado en forma de vapor generado por un vaper, con el objetivo de reproducir de manera más semejante las condiciones de la inhalación a las que se expone un usuario real al vapear, ya que, para transformar la esencia en vapor, pasa por un sistema de calentado (Córdoba, 2014). En contraste, el estudio de Effah et al. (2023) utilizó una metodología más simplificada, en el que se aplicó directamente la esencia en el cultivo celular, siendo este procedimiento menos realista, ya que, no estaría simulando la inhalación y el proceso de calentamiento de la esencia realizado por el vaper al tomar aire.

La metodología de exposición por vapor empleada en nuestro estudio ofrece una aproximación más certera, al incorporar la complejidad de la fase gaseosa y la deposición real de partículas sobre las células de monocito THP-1 humano, evaluando productos de la degradación térmica que se genera durante el calentamiento del dispositivo, los cuales han sido reportados como potencialmente tóxicos y potencialmente dañino para el sistema respiratorio como el aumento de ROS (Palazzolo, 2013).

Los resultados obtenidos a partir del ensayo MTT evidenciaron que todos los condensados por sí solos redujeron significativamente la viabilidad celular en las células THP-1, confirmando que inducen muerte celular en condiciones in vitro. Interesantemente, se observaron diferencias notables entre los tipos de condensado de tabaco, tanto con, como sin nicotina, mostrando los porcentajes más bajos de viabilidad celular (%), mientras que los condensados mentolados presentaron una menor citotoxicidad celular (%). Este hallazgo sugiere que la composición química asociada al sabor tabaco podría contener componentes o subproductos más dañinos para las células monocíticas que aquellos presentes en los líquidos sabor mentol una vez condensados.

Por otra parte, la diferencia entre los condensados con y sin nicotina, tanto en la variante de tabaco como en la de mentol, no fueron significativos, lo que podría indicar que la nicotina no constituye el principal factor determinante de la muerte celular observada en este modelo. De manera similar, otros estudios han demostrado que la exposición a los condensados de cigarrillos electrónicos puede

alterar el metabolismo celular y desencadenar respuestas inflamatorias incluso en ausencia de nicotina, ya que, los compuestos generados durante el calentamiento de los líquidos de vapeo provocan disfunción mitocondrial, aumento del estrés oxidativo y liberación de mediadores proinflamatorios en células epiteliales pulmonares y macrófagos humanos (THP-1) (Sinha et al., 2022). Estas alteraciones, asociadas a un incremento de especies reactivas de oxígeno y a la activación de vías inflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B, sugieren que la toxicidad de los vapeadores está más relacionada con sus componentes químicos y el proceso térmico de vaporización que con la nicotina en sí (Yuan et al., 2022), ya que, los principales componentes que se encuentran en las esencias de vapores son, propilenglicol (PG) y glicerina vegetal (VG) (Peace et al., 2016), pero luego del proceso térmico que involucra el vapeo se forman nuevos compuestos químicos tóxicos como aldehídos, formaldehído, acetaldehído, acroleína, carbonilos, compuestos orgánicos volátiles y metales pesados como níquel y cromo (Zhao et al., 2023). Estos compuestos están relacionados directamente con diferentes muertes celulares, el níquel se ha visto involucrado en muerte celular por ferroptosis y piroptosis (Vana et al., 2024), los compuestos de aldehídos generan disfunción mitocondrial, apoptosis mitocondrial (Bax/Bcl-2, caspasas) y daño al ADN (Wong et al., 2023; Kuntic et al., 2023).

Diversos estudios recientes sobre la patogénesis de la EVALI han indicado que la exposición a aerosoles de vapeo, especialmente aquellos que contienen vitamina E acetato (VEA) (un aditivo lipofílico empleado como espesante) está asociado directamente con la toxicidad pulmonar de esta enfermedad, provocando disfunción de macrófagos alveolares, aumento de ROS y daño oxidativo (McGraw et al., 2021; Warren et al., 2023). Así mismo, se ha descrito que la disminución del potencial de membrana mitocondrial y el incremento de ROS son eventos tempranos de citotoxicidad inducidos por aerosoles de vapeo (Clapp et al., 2019). En este contexto, los resultados obtenidos en las células THP-1, donde se activaron distintas vías de muerte celular asociadas a estrés oxidativo, sugieren que mecanismos similares podrían participar en la fisiopatología de EVALI. No obstante, al no identificarse una vía predominante en este estudio, es posible que otras formas de muerte celular, como por ejemplo, la oxiptosis y parthanatos, donde la primera, descrita por Holze et al. (2018), corresponde a una muerte celular inducida directamente por ROS y caspasa-independiente, característica que coincide con los tratamientos donde no se observó activación de caspasas pese a la elevada producción de ROS. Por su parte, parthanatos, ( Xu et al. 2024), se inicia por daño al ADN causado por ROS, un escenario compatible con el desbalance oxidativo observado en las células THP-1 expuestas a los condensados. En conjunto, estas vías emergen como candidatos razonables para explicar la muerte celular observada, especialmente considerando que las vías clásicas evaluadas (caspasas, ferroptosis, necroptosis, necrosis MPT y LDCD) no explican completamente la citotoxicidad registrada.

## **9. Conclusión**

Los resultados de este estudio confirman que todos los condensados de vapedor evaluados reducen la viabilidad de las células THP-1, independientemente de la presencia de nicotina, siendo los sabores tabaco los más citotóxicos. Ninguno de los inhibidores aplicados logró revertir dicha pérdida de viabilidad, lo que sugiere que las vías de muerte celular regulada evaluadas no serían las predominantes en este modelo, indicando que otras vías de muerte regulada pueden estar involucradas o la posible participación de mecanismos alternativos como parthanatos u oxeiptosis. Estos hallazgos refuerzan que los aerosoles de vapeo no son inocuos y pueden alterar de manera importante la función de células inmunes. A futuro, se recomienda profundizar en vías emergentes de muerte celular, incorporar técnicas de análisis más específicas y emplear modelos celulares más complejos que permitan comprender mejor el impacto real de los vapedores sobre el sistema respiratorio y su potencial relación con patologías como EVALI.

## **10. Bibliografía**

1. Organización Mundial de la Salud. Tabaco. Ginebra: OMS; (2022). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
2. Organización Panamericana de la Salud (2016). Informe sobre Control del Tabaco en la Región de las Américas A 10 años del Convenio Marco de la Organización Mundial de la Salud para el Control del Tabaco [Internet]. Washington, D.C.; 2016. <http://www.dejaloahora.cl/wpcontent/uploads/2015/04/2016-Informe-america-sobre-control-de-tabaco.pdf>
3. Organización Mundial de la Salud.(2024). Tobacco. OMS; [https://www.who.int/es/health-topics/tobacco#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/tobacco#tab=tab_1)
4. Burke, H., Leonardi-Bee, J., Hashim, A., Pine-Abata, H., Chen, Y., Cook, D. G., Britton, J. R., & McKeever, T. M. (2012). Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 129(4), 735–744. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2196>
5. Kuntic, M., Oelze, M., Steven, S., Krölller-Schön, S., Stamm, P., Kalinovic, S., Frenis, K., Vujacic-Mirski, K., Bayo Jimenez, M. T., Kvandova, M., Filippou, K., Al Zuabi, A., Brückl, V., Hahad, O., Daub, S., Varveri, F., Gori, T., Huesmann, R., Hoffmann, T., & Schmidt, F. P. (2019). Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: Evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH

oxidase (NOX-2). *European Heart Journal*, 41(26), ehz772.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz772>

6. Borrajo, C., Lühning, S., Pessoa, L., Díaz, G., Bendig, I., Corvalán, P., Cohen, M., & Pacheco Gallego, M. (2023). Documento de posición ALAT sobre el control del tabaco en Latinoamérica. *Revista científica respirar*  
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/10/1510828/document1.pdf>
7. Hamon, R., Thredgold, L., Wijenayaka, A., Bastian, NA y Ween, MP (2024). La exposición dual al vapor del cigarrillo electrónico y al humo del cigarrillo da como resultado una función más deficiente de las células de las vías respiratorias, los monocitos y los macrófagos que la exposición única. *Revista internacional de ciencias moleculares* , 25 (11), 6071.  
<https://doi.org/10.3390/ijms25116071>
8. Álvarez Mavárez, J. D., Mirambeaux Villalona, R. M., Raboso Moreno, B., Segrelles Calvo, G., Cabrera César, E., & de Higes-Martínez, E. B. (2023). Preguntas y respuestas en tabaquismo [Questions and Answers in Tobacco Smoking]. *Open respiratory archives*, 5(1), 100230.  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10369620/#bib0235>
9. J, P. E., E, M. P., Lozano, M., I., Durán, V., I., & T, P. T. (2000). Farmacología de la nicotina. *Medicina Integral*.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-farmacologia-nicotina-11678>
10. Organización Mundial de la Salud. (2023). Tobacco.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
11. Graud, Armand, Font-Mayolas, Sílvia, Eugènia Gras, María, Suñer, Rosa, & Noguera, Judit. (2007). Calidad de vida relacionada con la salud y consumo de tabaco. *Psychosocial Intervention*, 16(1), 79-92. Recuperado en 22 de

noviembre de 2024, de  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1132-0559200700010007&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1132-0559200700010007&lng=es&tlng=es)

12. Flouris, A. D., Vardavas, C. I., Metsios, G. S., Tsatsakis, A. M., & Koutedakis, Y. (2009). Biological evidence for the acute health effects of secondhand smoke exposure. *AJP Lung Cellular And Molecular Physiology*, 298(1), L3-L12. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00215.2009>
  
13. OPS (2022). Informe sobre el control del tabaco en la Región de las Américas [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56263/OPSNMHRF220023\\_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56263/OPSNMHRF220023_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
  
14. Corvalán B., María Paz. (2017). El tabaquismo: una adicción. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 33(3), 186-189. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-73482017000300186](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482017000300186)
  
15. Reynales L. (2012). El control del tabaco, estrategia esencial para reducir las enfermedades crónicas no transmisibles. <https://scielosp.org/pdf/spm/2012.v54n3/323-331/es#:~:text=cr%C3%B3nicas%20no%20transmisibles,-En%202008%2C%20cerca&text=Los%20principales%20factores%20de%20riesgo,muerte%20prevenible%20a%20nivel%20mundial>
  
16. Tamashiro, E., Cohen, N. A., Palmer, J. N., & Lima, W. T. (2009). Effects of cigarette smoking on the respiratory epithelium and its role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 75(6), 903–907. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)30557-7](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)30557-7)
  
17. Gutiérrez Maydata, Alfredo. (2003). Oxidantes en el humo del cigarro y

enfermedades cardiopulmonares. Revista Cubana de Medicina, 42(5) Recuperado en 21 de noviembre de 2024. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-7523200300050009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-7523200300050009&lng=es&tlng=es).

18. Córdoba, R. (2014). El desafío de los cigarrillos electrónicos. Atención Primaria, 46(6), 307-312. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2014.01.002>.
19. Palazzolo D. L. (2013). Electronic cigarettes and vaping: a new challenge in clinical medicine and public health. A literature review. Frontiers in public health, 1, 56. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00056>
20. Marques, P., Piqueras, L. y Sanz, MJ (2021). Una visión actualizada del impacto de los cigarrillos electrónicos en la salud humana. Respir Res 22 , 151 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01737-5>
21. Layden, J. E., Ghinai, I., Pray, I., Kimball, A., Layer, M., Tenforde, M., ... & Haupt, T. (2020). Pulmonary illness related to e-cigarette use in Illinois and Wisconsin—preliminary report. New England Journal of Medicine, 382(10), 903-916. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911614>
22. Blount, B. C., Karwowski, M. P., Shields, P. G., Morel-Espinosa, M., Valentin-Blasini, L., Gardner, M., ... & Wang, L. (2020). Vitamin E acetate in bronchoalveolar-lavage fluid associated with EVALI. New England Journal of Medicine, 382(8), 697-705. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916433>
23. Mukhopadhyay, S., Mehrad, M., Dammert, P., Arrossi, A. V., Sarda, R., Brenner, D. S., & Holt, G. E. (2020). Lung biopsy findings in severe pulmonary illness associated with e-cigarette use (vaping). American Journal of Clinical Pathology, 153(1), 30–39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz195>

24. Butt, Y. M., et al. (2019). Pathology of vaping-associated lung injury. *New England Journal of Medicine*, 381(18), 1780-1781. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1913069>
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). Outbreak of Lung Injury Associated with the Use of E-Cigarette, or Vaping, Products. [https://www.cdc.gov/tobacco/basic\\_information/e-cigarettes/severe-lung-disease.htm](https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/severe-lung-disease.htm)
26. Podguski, S., Kaur, G., Muthumalage, T., McGraw, M. D., Rahman, I. (2022). Noninvasive systemic biomarkers of e-cigarette or vaping use-associated lung injury: a pilot study. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35386827/>
27. MacNee, W. (2000). Oxidantes/antioxidantes y EPOC. *Chest*, 117(5), 303S–317S. [https://sci-hub.se/10.1378/chest.117.5\\_suppl\\_1.303S-a](https://sci-hub.se/10.1378/chest.117.5_suppl_1.303S-a)
28. Ma, T., Wang, X., Li, L., Sun, B., Zhu, Y., & Xia, T. (2020). Electronic cigarette aerosols induce oxidative stress-dependent cell death and NF-κB mediated acute lung inflammation in mice. *Archives of Toxicology*. <https://sci-hub.se/10.1007/s00204-020-02920-1>
29. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
30. Zahidah Nasuha Mohd Yasin, Fatin Najiah Mohd Idrus, Chee Hock Hoe, Get Bee Yvonne-Tee (2022), Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review, *Differentiation*, Volume 128, 2022, Pages 67-82, ISSN 0301-4681. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2022.10.001>.

31. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Andrews, D. W. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
32. Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Wang, Y., Ke, S., Wang, H., & Chen, J. (2021). Piroptosis: mecanismos y enfermedades. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), Article 128. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
33. Dai, Z., Liu, W. C., Chen, X. Y., Wang, X., Li, J. L., & Zhang, X. (2023). Gasdermin D-mediated pyroptosis: mechanisms, diseases, and inhibitors. *Frontiers in immunology*, 14, 1178662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178662>
34. Li, J., Cao, F., Yin, H., Han, X., Liu, Y., Li, Z., Zhou, J., & You, Y. (2020). Ferroptosis: pasado, presente y futuro. *Cell Death & Disease*, 11(1), Article 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
35. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Andrews, D. W. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
36. Zhou, W., & Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 35, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013>

37. Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., ... & Han, J. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
38. Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
39. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Andrews, D. W. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
40. Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
41. Robichaux, D. J., Harata, M., Murphy, E., & Karch, J. (2023). Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 174, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.11.003>
42. Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Halestrap, A. P., Javadov, S., Jones, S., Kowaltowski, A. J., Kristal, B. S., Lemasters, J. J., Ma, J., Ma, T., Macías, W. L., Marín-García, J., O'Rourke, B., Orozco-Morales, M., Palmer, J. W., Passamonti, S., Rizzuto, R., Sanyal, S., ... Ziemnicka, E. (2023). Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation*, 30(9), 1869–1885. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>
43. Bonora, M., Patergnani, S., Ramaccini, D., Morciano, G., Pedriali, G., Kahsay, A. E., Bouhamida, E., Giorgi, C., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2020). Physiopathology of the Permeability Transition Pore: Molecular Mechanisms

in Human Pathology. *Biomolecules*, 10(7), 998.  
<https://doi.org/10.3390/biom10070998>

44. Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-8)

45. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095505.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

46. Villaseca N, Forjan D. (2022). *Efecto de las esencias de vapeadores, tabaco con nicotina, tabaco sin nicotina, mentol con nicotina, tabaco sin nicotina sobre la línea celular THP-1 de monocitos humanos*. Universidad de Valparaíso. <https://repositoriobibliotecas.uv.cl/handle/uvscil/14691>

47. Mills CD, Fletcher FM (2021). Caspase inhibitors in clinical use. *Cell Death Dis.* 12(1):38. doi:10.1038/s41419-020-03336-5

48. Peter, M. E., & Thornberry, N. A. (2005). Caspases: Enlightening the executioners of apoptosis. *Science*, 307(5712), 1412–1413.  
<https://doi.org/10.1126/science.1102071>

49. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, (2012) *An iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. *Cell*. 149(5):1060–1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042

50. Skouta R, Dixon SJ, Wang J, Dunn DE, Orman M, Shimada K, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J Am Chem Soc.* 2014;136(12):4551–4556. doi:10.1021/ja411006a
51. Mihalik, R., Imre, G., Petak, I., Szende, B., Kopper, L., & Miseta, A. (2004). Cathepsin B-dependent cell death is induced by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 432–438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308532200>
52. Xie, Z., Wei, Y., Guo, J., Zhang, Y., Zhao, Y., & Chen, Y. (2023). Cathepsin B inhibition attenuates lysosomal membrane permeabilization-induced cell death in macrophages. *Cell Death Discovery*, 9(1), Article 34. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01313-4>
53. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434(7033):658–662. doi:10.1038/nature03434
54. Halestrap, A. P., McStay, G. P., & Clarke, S. J. (2004). The permeability transition pore complex: Another view. *Biochimie*, 86(2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.11.009>
55. Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112–119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>

56. Wu, J., Mei, L., Wang, S., Wang, H., Liu, J., & Tang, Y. (2021). Necrostatin-1 protection of dopaminergic neurons involves  $\text{RIPK1}$ ,  $\text{RIPK3}$  and  $\text{MLKL}$  signaling pathways in a Parkinson's disease model. *Experimental Cell Research*, 399(1), Article 112456. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112456>
57. Córdoba, R. (2014). El desafío de los cigarrillos electrónicos. *Atención Primaria*, 46(6), 307-312. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2014.01.002>.
58. Effah, F., Elzein, A., Taiwo, B., Baines, D., Bailey, A., & Marczylo, T. (2023). In Vitro high-throughput toxicological assessment of E-cigarette flavors on human bronchial epithelial cells and the potential involvement of TRPA1 in cinnamon flavor-induced toxicity. *Toxicology*, 496, 153617. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153617>
59. Palazzolo D. L. (2013). Electronic cigarettes and vaping: a new challenge in clinical medicine and public health. A literature review. *Frontiers in public health*, 1, 56. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00056>
60. Sinha, I., Goel, R., Bitzer, Z. T., Trushin, N., Liao, J., & Sinha, R. (2022). Evaluating electronic cigarette cytotoxicity and inflammatory responses in vitro. *Tobacco induced diseases*, 20, 45. <https://doi.org/10.18332/tid/147200>
61. Yuan, P., Wang, S., Li, Y., Wu, X., Wei, Z., Tang, H., Wang, J., Liu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2022). A novel immune-related gene signature for predicting prognosis and immunotherapy response in stomach adenocarcinoma. *Frontiers in Immunology*, 13, Article 910606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.910606>
62. Peace, M. R., Schmidt, D., Torres, G. V., & Williams, K. L. (2016). Driving under the influence of cannabis: A comparison of three laboratory methods for

the analysis of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) in whole blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(9), 675–680. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw091>

63. Zhao, S., Zhang, X., Wang, J., Lin, J., Cao, D., & Zhu, M. (2023). Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of organic compounds and heavy metals in electronic cigarettes. *Scientific reports*, 13(1), 16046. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43112-y>
64. Vana, F., Szabo, Z., Masarik, M., & Kratochvilova, M. (2024). The interplay of transition metals in ferroptosis and pyroptosis. *Cell division*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13008-024-00127-9>
65. Kuntic, I., Kuntic, M., Oelze, M., Stamm, P., Karpi, A., Kleinert, H., Hahad, O., Münzel, T., & Daiber, A. (2023). The role of acrolein for  $^1\text{E}$ -cigarette vapour condensate mediated activation of  $^2\text{NADPH}$  oxidase in cultured endothelial cells and macrophages.<sup>3</sup> *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 475(5), 807–821. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02825-9>
66. Wong, K., Cheow, Y. H., Tan, W. K., Tang, C. H., Tiong, Y. W., Chen, S. Y., Tey, H. M., & Hii, L. W. (2023).  $\text{ZnO}$  nanoparticle-induced mitochondrial-mediated apoptosis via activation of  $\text{Bax/Bcl-2}$  and caspase-3 in human keratinocytes. *Toxics*, 11(4), Article 373. <https://doi.org/10.3390/toxics11040373>
67. McGraw, C. E., Thampy, S., Shah, M., & Kim, M. S. (2021).  $\text{EVALI}$  and the role of high-dose corticosteroids: A systematic review. *Respiratory Medicine*, 182, Article 106403. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106403>

68. Warren, K. J., Beck, E. M., Callahan, S. J., Helms, M. N., Middleton, E., Maddock, S., Carr, J. R., Harris, D., Blagev, D. P., Lanspa, M. J., Brown, S. M., & Paine, R., 3rd (2023). Alveolar macrophages from EVALI patients and e-cigarette users: a story of shifting phenotype. *Respiratory research*, 24(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02455-w>
69. Clapp, P. W., Lavrich, K. S., van Heusden, C. A., Lazarowski, E. R., Carson, J. L., & Jaspers, I. (2019). Cinnamaldehyde in flavored e-cigarette liquids temporarily suppresses bronchial epithelial cell ciliary motility by dysregulation of mitochondrial function. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 316(3), L470–L486. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00304.2018>
70. Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C., Haas, D. A., Benda, C., Hubel, P., Pennemann, F. L., Schnepf, D., Wettmarshausen, J., Braun, M., Leung, D. W., & Pichlmair, A. (2018). *Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway*. *Nature Immunology*, 19(2), 130–140. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0013-y>
71. Xu, L., Ma, S., Qu, M., Li, N., Sun, X., Wang, T., Chen, L., Zhu, J., Ding, Y., Gong, Y., Hu, F., Dong, Z., Zhang, R., Wang, J. H., & Zhou, H. (2024). *Parthanatos initiated by ROS-induced DNA damage is involved in intestinal epithelial injury during necrotizing enterocolitis*. *Cell Death Discovery*, 10, 345. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02114-z>

## **Anexo 1**

### **Bioética y bioseguridad**

- El uso de líneas celulares inmortalizadas, como el monocito THP-1, en investigaciones *in vitro* no suele requerir la revisión de un comité de bioética debido a varias razones que enlistarán a continuación.

#### **1. La ausencia de sujetos humanos o animales vivos.**

- Las líneas celulares inmortalizadas son cultivos que derivan de tejidos humanos o animales, pero que han sido modificados o seleccionados para crecer de manera indefinida en el laboratorio. Estas células no representan o no son reconocidas como un organismo vivo, ni implican interacción directa con personas o animales vivos, lo que elimina consideraciones éticas relacionadas con su obtención o uso.

#### **2. Son obtenidas de manera legal y autorizada.**

- Las líneas celulares inmortalizadas utilizadas en investigación generalmente provienen de fuentes comerciales o bancos de células reconocidos que cumplen con estándares éticos y legales (Como la ATCC, American Type Culture Collection, desde donde provienen los monocitos THP1 (TIB-202) (que serán utilizados en esta tesis). Esto asegura que las células fueron obtenidas bajo procedimientos éticos previamente aprobados, como el consentimiento informado inicial en el caso de tejidos humanos.

#### **3. Fines experimentales controlados.**

- Los estudios *in vitro* se realizan en ambientes completamente controlados y limitados al laboratorio, sin impacto directo en seres vivos o en la sociedad. Este tipo de experimentación se considera de bajo riesgo desde el punto de vista ético y bajo normas de bioseguridad específicas de cada laboratorio.

#### **4. Se ajusta a directrices internacionales.**

- Instituciones internacionales, como el CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences), establece que los estudios que no involucren sujetos humanos o animales, sino únicamente materiales derivados, como líneas celulares inmortalizadas, no requieren aprobación bioética siempre que su uso sea responsable y conforme a los estándares científicos aceptados.
- No obstante, pese a que no es necesaria la evaluación de un comité de bioética, es importante que los investigadores consideren aspectos de bioseguridad como la eliminación de elementos cortopunzantes, residuos biológicos y reactivos utilizados durante el desarrollo de la investigación.
- A continuación, se detallan los mecanismos de bioseguridad estándar para la eliminación de residuos generados durante la presente tesis.

### **VALORACIÓN DE ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.**

En esta investigación no se utilizarán cultivos de microorganismos patógenos y/o no patógenos.

En esta investigación no se realizará manipulación genética de microorganismos.

En esta investigación se utilizarán cultivos celulares. se utilizarán líneas inmortalizadas de monocito humano (THP-1) provenientes del proveedor internacional ATCC. Todos los residuos biológicos generados, son desechados en contenedores especiales para residuos biológicos y retirados por una empresa especialista en tratamiento de este tipo de residuos.

En esta investigación no se realizará manipulación genética de células u organismos.

De acuerdo con el plan de manejo de REAS (Residuos de Establecimientos de Atención de Salud) del edificio R3 de la Universidad de Valparaíso:

Los ácidos y bases se eliminan en contenedores adecuadamente rotulados, los cuales no deben superar  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, una vez neutralizados (aunque se preparan en la cantidad que se requiere).

Mientras se utilizan solventes inflamables no se enciende llama alguna.

Toda manipulación con irritantes se hace bajo campana, utilizando guantes de látex, en caso de derrame existe ducha emergencia.

La eliminación de los REAS se realiza periódicamente por una empresa transportista externa, PROCESOS SANITARIOS S.A., con quien la Universidad de Valparaíso posee actualmente un convenio. El tiempo de retiro está estimado en no más de 6 meses desde la generación de los residuos o antes de acuerdo con la visita programada por la empresa contratista externa.

Los materiales plásticos empleados no son reutilizados y los REAS son desechados en contenedores especiales para solventes químicos bien rotulados según su naturaleza. La eliminación de material plástico desechable contaminado con sustancias químicas es tratada como residuo peligroso, por lo tanto, eliminado en contenedores plásticos de color rojo.

El preparado de los reactivos se realiza en material de vidrio especial para uso en laboratorio, por lo que una vez utilizados se procede a lavar con abundante agua y detergente, se enjuaga en agua destilada, es secado en estufa y reutilización.

El material plástico como eppendorf, se desechan en el contenedor de plástico cerrado y rotulados.

El laboratorio de bioensayos cuenta con campana extractora con mantención al día, antiparras de protección, guantes de nitrilo y además, si es que se requiere, se cuenta con mascarilla anti gases y vapores, resguardando el correcto uso de este elemento de protección personal.

Los guantes de nitrilo son desechados como residuos peligrosos en contenedores rojos bien rotulados y el resto de los equipos son limpiados y reutilizados.

En esta investigación no se utilizará material radioactivo.

En esta investigación no se utilizará material cortopunzante o material de vidrio que pueda generar riesgo.

En esta investigación se utilizarán y/o generarán desechos biológicos (muestras de tejidos y/o fluidos biológicos humanos, de animales de experimentación u otros organismos). Los cuales serán desechos biológicos (células inmortalizadas).

Los REAS producto de esta actividad serán eliminados en cloro comercial (30%), para eliminar posibles patógenos y derivados de la sangre, dentro de contenedores resistentes (botellas) para residuos peligrosos bien rotulados, hasta su traslado y eliminación por parte de PROCESOS SANITARIOS S.A.

En esta investigación no se utilizarán dispositivos o equipos generadores de agentes físicos tales como temperaturas extremas, presiones extremas, ruido, radiaciones UV, IR, RX.

En esta investigación no se contempla el traslado de muestras biológicas o químicas que forman parte de la investigación (no corresponde a residuos para desecho).

### **3.COMPROMISO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.**

Los investigadores individualizados en la primera página de esta solicitud, declaran haber leído el Manual de Bioseguridad de CONICYT versión 2008 en los tópicos atinentes a su proyecto y se comprometen a seguir las indicaciones de dicho Manual relacionadas con su proyecto, así como las normas descritas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la Universidad de Valparaíso (Decreto exento 1239 del 28 de mayo de 2003).

Los investigadores declaran también que toda la información descrita en este formulario es fidedigna y sin omisiones, comprometiéndose a presentar al CB-UV cualquier modificación al protocolo para una nueva certificación.

### **ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.**

**Título:** Vías de muerte celular regulada específicas generadas al exponer células de la línea thp-1 de monocitos humanos al condensado de vapeadores con esencia de tabaco sin nicotina; mentol con nicotina y mentol sin nicotina.

**Tesistas:**Barbara Muñoz Baack y Luciano Parada Barrientos

**Profesor guía responsable:** Carlos Jara Gutiérrez

**Dependencia(s) de la Universidad de Valparaíso donde se desarrollará la investigación:**

Laboratorio de Bioensayos – Centro Interdisciplinario de Investigaciones Biomédicas e Ingeniería para la Salud (MEDING) – Edificio R3 – Campus Reñaca – Universidad de Valparaíso.

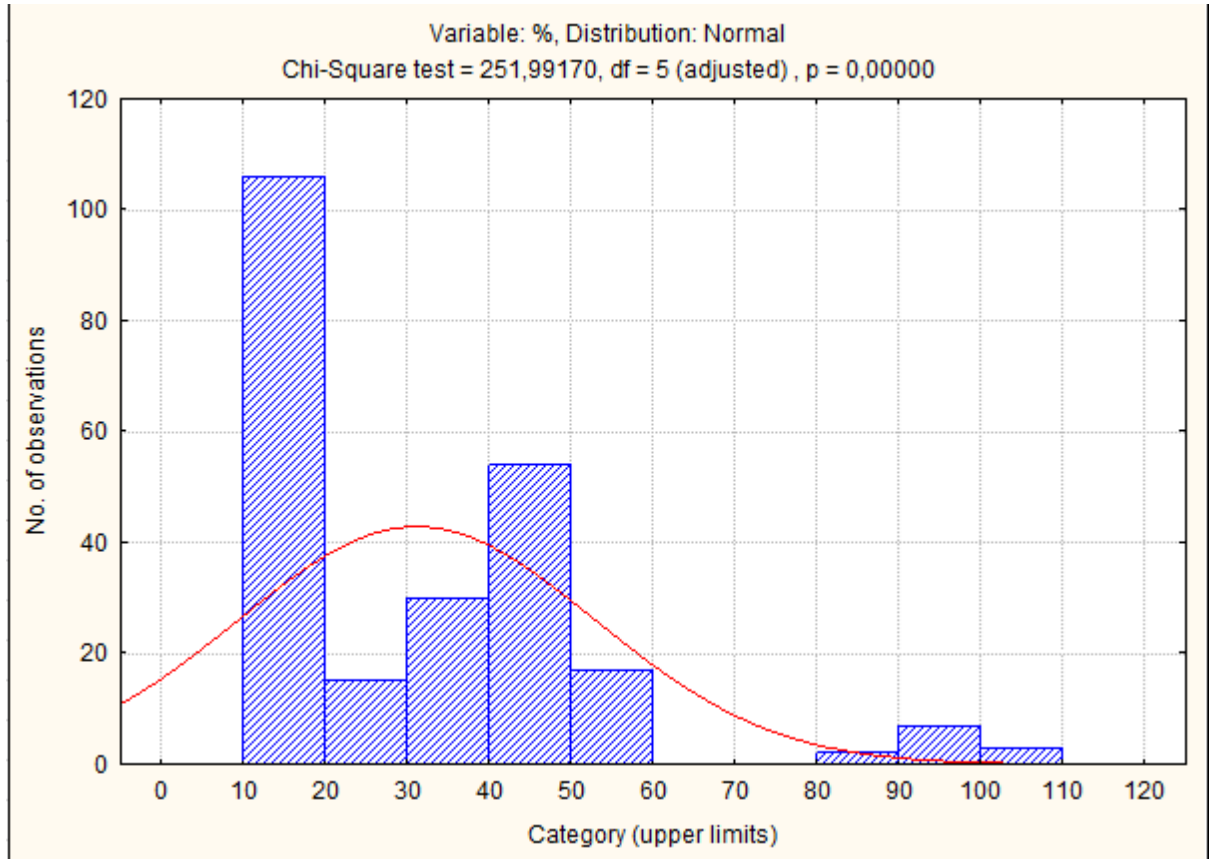
**Objetivo general de la investigación:**

Evaluar a través de inhibidores, las vías de muerte celular regulada (RCD) que se activan al exponer monocito humano (línea THP-1) al condensado de vapeador.

**Objetivos específicos de la investigación:**

1. Determinar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a pyroptosis usando el inhibidor Z-VAD-FMK.
2. Identificar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a ferroptosis usando el inhibidor Ferrostatina.
3. Establecer si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a muerte que depende del lisosoma usando el inhibidor CA-074M2.
4. Demostrar si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a autofagia usando el inhibidor ciclosporina.
5. Definir si la vía de muerte celular regulada activada por condensador de vapeador en la línea THP-1 corresponde a necroptosis usando el inhibidor necrostatina.

## Anexo 2. Análisis estadístico



	CS	C+	MSN	MSN+Z-V	MSN+Nec	MSN+Fer	MSN+CA	MSN+Cic	MCN	MCN+Z-V	MCN+Nec	MCN+Fer	MCN+CA	MCN+Cic	TSN	TSN+Z-V	TSN+Nec	TSN+Fer	TSN+CA	TSN+Cic	TCN	TCN+Z-V	TCN+Nec	TCN+Fer	TCN+CA	TCN+Cic		
CS	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	
C+	0.000020		0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.087645	0.010448	0.002240	0.010711	0.004409	0.005609	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN	0.000020	0.000020		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.012072	0.097943	0.259617	0.096113	0.176442	0.151425	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN+Z-V	0.000020	0.000020	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.000856	0.011316	0.043591	0.011039	0.025073	0.020297	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN+Nec	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	0.001282	0.016055	0.058907	0.015673	0.034633	0.028251	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN+Fer	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	0.009570	0.081888	0.225853	0.080307	0.150809	0.128628	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN+CA	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	0.004742	0.047195	0.145256	0.046203	0.092369	0.077437	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MSN+Cic	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		0.006197	0.058376	0.172568	0.057186	0.111724	0.094269	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN	0.000020	0.087645	0.012072	0.000856	0.001282	0.009570	0.004742	0.006197		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN+Z-V	0.000020	0.010448	0.097943	0.011316	0.016055	0.081888	0.047195	0.058376	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN+Nec	0.000020	0.002240	0.259617	0.043591	0.058907	0.225853	0.145256	0.172568	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN+Fer	0.000020	0.010711	0.096113	0.011039	0.015673	0.080307	0.046203	0.057186	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN+CA	0.000020	0.004409	0.176442	0.025073	0.034633	0.150809	0.092369	0.111724	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
MCN+Cic	0.000020	0.005609	0.151425	0.020297	0.028251	0.128628	0.077437	0.094269	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020
TSN	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TSN+Z-V	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	0.999925	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TSN+Nec	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	0.999950	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TSN+Fer	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	0.999966	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TSN+CA	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TSN+Cic	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	0.999925	0.999950	0.999966	1.000000		1.000000	0.999986	0.999986	0.999999	0.999999	0.999999	0.999927
TCN	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TCN+Z-V	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.999986	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TCN+Nec	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.999986	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
TCN+Fer	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.999989	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000
TCN+CA	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.999989	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000	1.000000
TCN+Cic	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	0.000020	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.999927	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000