



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Evaluación de la respuesta antioxidante y el daño tóxico en pulmón de ratas
expuestas a diferentes tipos de material particulado (PM)”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA:

Ing. Amb. Adriana Razo García

Directores:

Dr. Germán A. Chamorro Cevallos

Dra. Andrea M.G. De Vizcaya Ruiz



México, DF.

2010

El presente trabajo se realizó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Laboratorio de Toxicología Preclínica) y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Laboratorio 22 de Contaminantes Atmosféricos y Estrés Oxidativo del Departamento de Toxicología), bajo la dirección de los doctores Germán A. Chamorro Cevallos y Andrea M.G. De Vizcaya Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por otorgarme la beca para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Andrea M.G. De Vizcaya Ruiz y al Dr. Germán Chamorro Cevallos, por confiar en mí y por su valiosa guía a lo largo de este trabajo.

A la Bióloga Marisela Uribe Ramírez del Laboratorio 22 del Departamento de Toxicología CINVESTAV-IPN (Unidad Zacatenco) por su ayuda en la estandarización de las técnicas de la instilación endotraqueal, inmunodetección y carbonilación de proteínas, usadas en el presente trabajo.

A las doctoras Leticia Garduño Siciliano, Marcela Galar Martínez, Elizdath Martínez Galero y Araceli Hernández Zavala por sus asesorías y consejos para el desarrollo de la presente tesis.

RESUMEN

El material particulado (PM) representa uno de los indicadores de contaminación atmosférica que ha sido más claramente relacionado con efectos nocivos a la salud. Diversos estudios epidemiológicos reportan que la contaminación por PM se asocia con incrementos en la hospitalización de enfermedades cardiopulmonares, entre otras. Debido a su tamaño aerodinámico, las PM tienen la capacidad de penetrar en las vías respiratorias profundas, e inducir estrés oxidante y en los últimos años se ha demostrado que la composición química y la naturaleza de las PM es determinante en la inducción de estos efectos biológicos, así como de la capacidad que tienen para inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Para conocer más sobre los procesos involucrados en la inducción de los efectos biológicos mediante los cuales las PM inducen estrés oxidante y la capacidad del organismo para defenderse, en este trabajo se evaluó la respuesta antioxidante (hemoxigenasa-1, HO-1) y el daño tóxico (carbonilación de proteínas) en el pulmón de ratas expuestas a PM químicamente distintas (PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a y partículas de diesel-DEP) por medio de la instilación endotraqueal, con el propósito de estudiar el efecto tóxico inducido por una dosis única. En el presente trabajo se observó que a las 24 hr de exposición, no se indujo la expresión de la HO-1 con ningún tipo de PM (PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a y DEP). Sin embargo a las 48 hr de exposición se observó un incremento de la HO-1, estadísticamente significativo con respecto al control con las DEP, la exposición a PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a no indujo HO-1. La exposición a distintos tipos de PM tampoco evidenció la carbonilación en proteínas de tejido pulmonar a las 24 hr. No obstante, a las 48 hr de exposición se observó un aumento de la carbonilación con PM_{2.5}, PM₁₀, aunque no fue estadísticamente significativo. Las características físicoquímicas de PM determinan la inducción de la HO-1 y carbonilación proteínas, DEP se evidenció como las PM con mayor potencial de inducir HO-1 a las 48 h post-exposición, posiblemente debido a su contenido de compuestos orgánicos, a diferencia de lo observado con PM_{2.5}, PM₁₀ y NIST 1649a que no indujeron HO-1. DEP no promovió carbonilación, sin embargo PM_{2.5}, PM₁₀, NIST 1649a fueron las más PM que presentaron más oxidación en comparación con DEP, probablemente debido a la interacción con las proteínas de los metales en el tejido pulmonar. Llegamos a la conclusión de que las interacciones bioquímicas entre los diferentes componentes químicos de la PM influyen en la inducción de la respuesta antioxidante y el daño oxidativo.

ABSTRACT

Particulate matter (PM) is one of the parameters of air pollution that has been most clearly associated with adverse health effects. Several epidemiological studies report that PM pollution is associated with increases in hospitalization for cardiopulmonary diseases, among others. Due to their aerodynamic size, PM has the ability to penetrate the deep airways, and induce oxidative stress, and in recent years it has been shown that the chemical composition and nature of PM is critical in inducing the biological effects as well as the ability to induce the generation of reactive oxygen species (ROS). To learn more about the processes involved in the induction of biological effects by which PM induce oxidative stress and the organism's ability to defend it self in this study we evaluated the antioxidant response (heme oxygenase-1, HO-1) and toxic damage (protein carbonylation) in the lungs of rats exposed to chemically distinct PM (PM_{2.5}, PM₁₀, Dust NIST 1649 and diesel particles DEP) through a single endotracheal instillation. At 24 hr after exposure, the expression of HO-1 with all PM-types (PM_{2.5}, PM₁₀, Dust NIST 1649 and DEP) was not observed. However at 48 hr of exposure an increase of HO-1 was observed, it resulted statistically significant compared to the control with the DEP, although exposure to PM_{2.5}, PM₁₀, Dust NIST 1649 did induce HO-1, but not consistently and statistically different. Exposure to different types of PM did not show protein carbonylation of lung tissue at 24 hr. However, after 48 hr protein carbonylation was observed with PM_{2.5}, PM₁₀, although not statistically significant. His physicochemical characteristics of PM determined the induction of HO-1 and protein carbonylation, DEP presented the greatest potential to induce HO-1 at 48 hr post-exposure possibly due to its organic content, in contrast to what was observed with PM_{2.5}, PM₁₀, NIST 1649a urban dust that did not induce HO-1. DEP did not induce carbonylation, however PM_{2.5}, PM₁₀, NIST 1649a urban dust were most oxidizing PM when compared to DEP, probably due to the interaction of metals with proteins in the lung tissue. We conclude that the biochemical interactions between different chemical components of PM influence the induction of the antioxidant response and oxidative damage.

LISTA DE TABLAS

	Página:
Tabla 1. Principales fuentes fijas y móviles de contaminación atmosférica	1
Tabla 2. Inventario porcentual de emisiones anuales ZMVM, 2006	2

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Principales fuentes emisoras de PM en la ZMVM (RAMA, GDF)	3
--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Asociación con la mortalidad de enfermedades cardiorespiratorias	8
Figura 2. Reacción de Fenton	10
Figura 3. Diseño experimental	17
Figura 4. Instilación endotraqueal de ratas a diferentes tipos de PM	19
Figura 5. Inmunodetección de HO-1 en pulmón de rata 24 post exposición	27
Figura 6. Inmunodetección de HO-1 en pulmón de rata 48 post exposición	28
Figura 7. Carbonilación de proteínas (inmunodetección) 24 post exposición	30
Figura 8. Carbonilación de proteínas (inmunodetección) 48 post exposición	31

ABREVIATURAS

ARE	elemento de la respuesta antioxidante
BSA	seroalbúmina bovina
°C	grados centígrados
CAT	catalasa
CCA	Comisión de Cooperación Ambiental
CO	monóxido de carbono
COV's	compuestos orgánicos volátiles
DEP	partículas del diesel (Diesel Exhaust Particles)
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERC	especies reactivas de carbonilo
ERO	especies reactivas de oxígeno
Fe	hierro
g	gramos
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación
GST	glutación S transferasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HAPs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
HO-1	hemoxigenasa-1
hr	horas
IE	instilación endotraqueal
kg	kilogramos

MAP cinasas

μg microgramos

mg miligramos

NIST National Institute of Standards and Technology

NO_2 dióxido de nitrógeno

O_3 ozono

OMS Organización Mundial de la Salud

Pb plomo

PBS solución de buffer de fosfatos

PKC proteína quinasa C

PM material particulado

RAMA Red Automático de monitoreo atmosférico

ROFA ceniza de aceite residual

RPE resonancia paramagnética del electrones

SD Sprague-Dawley

SDS dodecil sulfato de sodio

SMA Secretaría del Medio Ambiente

SO_2 dióxido de azufre

SOD superóxido dismutasa

TA temperatura ambiente

TRx tiorredoxina

ZMVM Zona Metropolitana del Valle de México

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

RESUMEN

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contaminación atmosférica	1
1.2 Contaminación por Material Particulado (PM)	3
1.2.1 Definición	3
1.3 Composición química y clasificación de PM	4
2. EFECTOS TÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A PM	6
2.1 Estudios de exposición in vivo e in vitro a PM	8
3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDANTE	9
3.1 Mecanismos estrés oxidante inducido por PM	10
3.2 La exposición a PM, la inducción de estrés y daño oxidante	10
3.3 Respuesta antioxidante	12
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. HIPÓTESIS	15
6.OBJETIVOS	16
6.1 GENERAL	16
6.2ESPECIFICOS	16

	Página
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Diseño Experimental	17
7.2 Preparación de la suspensión de PM	18
7.3 Instilación endotraqueal	18
7.3.1 Procedimiento	18
7.4 Recolección de tejidos post-exposición	19
7.5 Homogenado de tejido y extracción de proteína total	20
7.5.1 Procedimiento de la evaluación de la respuesta antioxidante	20
7.5.2 Procedimiento de la evaluación del daño tóxico	20
7.6 Determinación de proteína	20
7.6.1 Procedimiento para la determinación de proteína	21
7.7 Electroforesis para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico	21
7.7.1 Procedimiento para la preparación de la muestra para evaluación de la respuesta antioxidante	22
7.7.1.2 Preparación de la muestra para evaluación del daño tóxico	22
7.7.2 Separación electroforética para la evaluación de las respuestas antioxidante y daño tóxico	22
7.8 WESTERN BLOT para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico	23
7.8.1 Procedimiento para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico	23
7.8.2 Procedimiento para la inmunodetección para la evaluación de la respuesta antioxidante	24
7.8.3 Procedimiento para la inmunodetección para la evaluación del daño tóxico	24

7.9 Análisis densitométrico para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico	25
7.10 Métodos estadísticos y análisis de datos	25
8. RESULTADOS	26
8.1 Expresión de HO-1 después de la exposición a diferentes tipos de PM	26
8.2 Carbonilación de proteínas después de la exposición a diferentes tipos de PM	29
9. DISCUSIÓN	33
9.1 Respuesta antioxidante	33
9.2 Carbonilación de proteínas	39
10. CONCLUSIONES	42
11. REFERENCIAS	43
ANEXO. Reactivos y soluciones	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación atmosférica

En la actualidad la calidad del aire de grandes ciudades se presenta como uno de los problemas ambientales de mayor relevancia debido a la cantidad de personas expuestas a compuestos contaminantes y potencialmente tóxicos a la salud, así como la persistencia de estos en el aire.

La contaminación atmosférica se define como la presencia en el aire de una o más sustancias que al incorporarse y actuar en la atmósfera alteran o modifican su composición natural y que en concentraciones suficientes interfieren con la salud humana y el medio ambiente.

Los contaminantes presentes en la atmósfera proceden dos tipos de fuentes emisoras bien diferenciadas: las naturales y las antropogénicas. En el primer caso la presencia de contaminantes se debe a causas naturales, mientras que en el segundo tiene su origen en las actividades humanas. Las emisiones primarias originadas por fuentes naturales provienen fundamentalmente de los volcanes, incendios forestales, descomposición de la materia orgánica y erosión del suelo. Por su parte, los principales focos antropogénicos de emisiones primarias los podemos clasificar en fuentes fijas y móviles, como se describe en la Tabla 1 (Jiménez., 2002).

Tabla 1. Principales fuentes fijas y móviles de contaminación atmosférica.

Fuentes fijas		Fuentes móviles		
Industriales	Domésticas	Puntuales	Vehículos automóviles	{ Motores pesados Motores ligeros
Procesos industriales Instalaciones fijas de combustión	Instalaciones de calefacción	Tintorerías Imprentas		Aeronaves Buques

La creciente actividad económica de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) ha ido acompañada de elevados niveles de emisión de contaminantes. A esto se suman condiciones urbanas y topográficas propias de la cuenca, que junto con factores meteorológicos, han influido en los altos índices de contaminación atmosférica registrados en los últimos años (SMA, 2009).

El problema de la calidad del aire ha alcanzado grandes dimensiones. El crecimiento de la población y su demanda de servicios ha incrementado enormemente las necesidades de energía y transporte. Según las estimaciones obtenidas del inventario de emisiones del año 2008, el sector móvil contribuye con más del 80 por ciento de los gases y partículas contaminantes que se emiten a la atmósfera de la ZMVM (SMA, 2009).

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA – por sus siglas en inglés) se consideran como contaminantes criterio de la calidad del aire al ozono (O₃), dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), plomo (Pb) y partículas suspendidas en el aire o material particulado (PM) debido a que afectan el bienestar y la salud humana. La producción de contaminantes es preocupante, cada año la ZMVM genera porcentajes considerables de contaminantes en sus diferentes fuentes de emisión (SMA, 2009) (Tabla 2):

Tabla 2. Inventario porcentual de emisiones anuales ZMVM, 2006 (SMA-GDF)

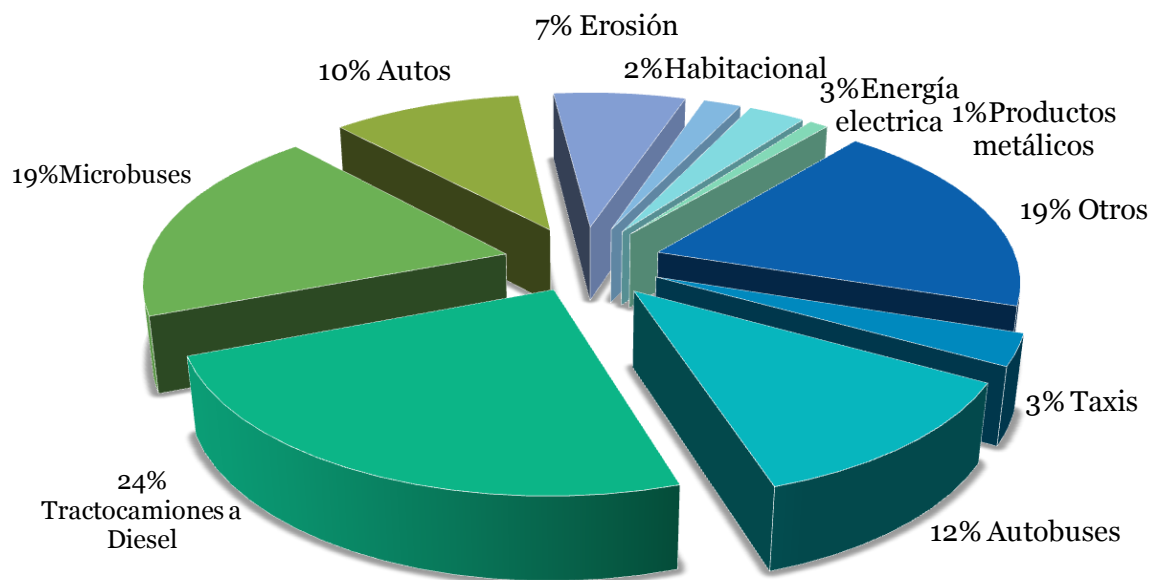
Sector	Emisiones [%]							
	PM ₁₀	PM _{2.5}	SO ₂	CO	NO _x	COT	COV	NH ₃
Fuentes puntuales	21.1	13.3	51.4	0.3	10.9	12.7	18.9	1.0
Fuentes de área	52.6	22.1	0.5	0.4	6.5	60.6	42.1	77.2
Fuentes móviles	22.8	61.9	48.1	99.3	81.9	23.6	34.1	21.8
Vegetación y suelos	3.5	N/A	N/A	N/A	0.6	3.1	4.9	N/A

Fuente: Dirección de inventario y modelaciones de emisiones DGGAA-SMA-GDF
N/A: No aplica

1.2 Contaminación por Material Particulado (PM)

1.2.1 Definición

La partícula es un término que se emplea para describir las materias sólidas y líquidas arrastradas por el aire, con diferentes orígenes producidos por condensación, nucleación, trituración o productos de la combustión, además de los deficientes procesos de molienda en seco. Las PM representan casi el 10% de la masa total de los contaminantes en el aire en la ZMVM y han sido asociados extensamente a desórdenes de la salud como problemas pulmonares y afecciones cardíacas (Pope y cols., 2002). En la ZMVM la Red automática de monitoreo atmosférico (RAMA) reporta que los niveles de PM emitidas por tracto camiones a diesel, contienen el mayor % de emisión (Gráfica 1).



Fuente: GDF Inventario de emisiones de la ZMVM 2000

Gráfica 1. Principales fuentes emisoras de PM en la ZMVM (RAMA, GDF)

Además participan en el incremento de reacciones químicas en la atmósfera, reducen la visibilidad y aumentan la posibilidad de la precipitación, la niebla y las nubes, e influyen en la radiación solar y los cambios de temperatura ambiental. La magnitud del problema en

cada una de las áreas de estudio anteriores, es una función del intervalo de tamaño de partículas y las composiciones químicas y físicas de las PM (Pope y cols., 2002; Pope y cols., 2006).

En la última década un número importante y cada vez mayor de estudios muestran una asociación entre la exposición a PM y la incidencia de enfermedades cardiorrespiratorias (Pope y cols., 2002; Pope y cols., 2006). Del mismo modo de acuerdo a la Comisión de Cooperación Ambiental, la contaminación atmosférica está asociada con la mortalidad infantil y el desarrollo de asma, lo que puede influir en el desarrollo adecuado de los pulmones en niños expuestos y causar efectos duraderos en la salud respiratoria (CCA, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que no hay límite seguro para evitar los efectos nocivos de las partículas, por lo que se recomienda disminuir sus concentraciones tanto como sea posible (OMS, 2009).

1.3 Composición química y clasificación de PM

Las PM son mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos que varían en tamaño, origen y composición. El proceso de formación de PM incluye la nucleación de gases con baja presión de vapor, emitidos de las fuentes de emisión o formados en la atmósfera, condensación de gases con baja presión de vapor sobre las partículas ya existentes y coagulación de las partículas. Por lo tanto, cualquiera de las partículas presentes en el aire puede contener material de diversas fuentes de emisión (Wilson y cols., 2002).

Existen tres clasificaciones principales para las PM de acuerdo a su tamaño aerodinámico, (tamaño adoptado al interactuar la partícula con el aire): **ultrafinas** (<1.0 µm), **finas o**

PM_{2.5} ($\leq 2.5 \mu\text{m}$) y **PM₁₀** ($\leq 10 \mu\text{m}$). La composición química de las partículas atmosféricas es muy diversa, entre los componentes más frecuentes que se han identificado se encuentran: metales como el Zn, Pb, V, Fe, Cu, Mn, Ni, Cr, Si; algunos iones como sulfatos, nitratos, amonio y cloruros (Vega y cols., 2004); compuestos orgánicos volátiles (COV's), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) como el benceno y benzo[a]pireno. Además de carbono orgánico y elemental conforman a la partícula en su mayoría (Arriaga-Colin y cols., 2004).

Por otro lado, las emisiones de tractocamiones a diesel son una de las principales fuentes contaminantes de PM en la ZMVM. Las PM de diesel (DEP- por sus siglas en inglés) son partículas finas, que se sabe, son emitidas por los automotores a diesel, incrementando así, la emisión de estas en la atmósfera y se sabe, son causantes de alteraciones a la salud (Yank., 1994). Las DEP son muy finas y tienden a hacer aglomerados densos. La principal partícula de carbono tiene un diámetro entre 0,01 - 0,08 micras, mientras que el diámetro las partículas aglomeradas se encuentra en el rango de 0,08 - 1 micras. Así, DEP es totalmente respirable y tienen un impacto significativo en la salud humana. Se ha clasificado por varios gobiernos como "cancerígeno o probablemente cancerígeno para el hombre". Es sabido que el riesgo de enfermedades cardíacas y respiratorias aumenta (Yang, 1994). Los compuestos más nocivos de cuatro y cinco anillos están presentes en la fracción orgánica del DEP (Yang, 1994; García-Lozada, 2006)

Tomado en cuenta los niveles actuales que se reportan para PM₁₀ y PM_{2.5} en grandes centros urbanos como la ZMVM, es relevante investigar con mayor profundidad la influencia de la composición química de las PM en los efectos adversos a la salud ya que en general los niveles de PM son reportados con respecto a la masa de PM por unidad de volumen de aire, sin embargo, la relación de la concentración de compuestos químicos

contenidos en las PM con respecto a su potencial toxicidad son factores que pudieran ayudar un mejor entendimiento en el desarrollo de las enfermedades relacionadas con este contaminante ambiental.

2. EFECTOS TÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A PM

Se ha establecido que las PM están involucradas en diversas patologías a nivel pulmonar debido a que han sido relacionadas con procesos inflamatorios en las vías respiratorias profundas, lo que puede desencadenar enfermedades como el asma y la bronquitis crónica e interferir con la respuesta inmune a agentes infecciosos a nivel pulmonar (Nel, 2005). Las PM también son un factor de riesgo para afecciones cardiovasculares ya que incrementos en los niveles de PM han sido asociados con infartos, arritmias y muerte súbita (Pope y cols., 2004).

Las PM menores a 2.5 micrómetros han sido relacionadas con síntomas simples de irritación ocular y complicaciones cardíacas o respiratorias. Sin embargo, existe aún mucha controversia en este sentido ya que PM de mayor tamaño, PM_{2.5-10}, también pueden contribuir de manera importante en la inducción de efectos adversos, especialmente debido a la toxicidad directa ejercida por el depósito de PM en sitios específicos a nivel de las ramas bronquiales (Balásházy y cols., 2003). Por lo que diversos autores han propuesto que es necesario conocer con mayor profundidad la relación de la toxicidad de las PM con respecto a su tamaño y composición química (Nel y cols., 2005; Pope y Dockery, 2006).

Se sugiere que las PM tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) y que esta capacidad está determinada por su composición química. Las PM comparten algunas de sus propiedades físicoquímicas con polvos minerales, como el asbesto y el sílice, que se han reportado como potentes agentes tóxicos que actúan a través de mecanismos oxidantes (Churg y cols., 1997; Mossman, 2000). Asimismo, PM de orígenes conocidos como

son la ceniza de aceite (ROFA- por sus siglas en inglés), ceniza de carbón y partículas de emisión de diesel (DEP por sus siglas en inglés), que han sido ampliamente estudiadas, han sido reportadas como potentes agentes pro-oxidantes *in vitro* e *in vivo* (Baeza-Squiban y cols., 1999; Kadiiska y cols., 1997; Nel y cols., 2001). Valavanidis y cols., (2005) reportan que PM obtenidas de distintas fuentes de emisión (partículas de emisión de diesel y gasolina, partículas suspendidas totales y de quema de madera) generaron anión superóxido y radicales hidroxilo determinados mediante resonancia paramagnética del electrones (RPE). Los autores establecen que la presencia de radicales tipo quinonas y iones de metales de transición juegan un papel importante en la generación de las ERO. Asimismo Tao y cols. (2003) reportan que la composición de las PM determina el tipo e intensidad de la respuesta tóxica debido a sus componentes como metales, semi-quinonas, lipopolisacáridos y compuestos orgánicos como los HAPs que estimulan la generación de ERO, desencadenando procesos de estrés oxidante.

Es así que distintos estudios han establecido una correlación importante entre diversos mecanismos de daño como estrés oxidante, inflamación, inducción de eventos promotores de la coagulación y respuestas isquémicas del miocardio con la exposición a PM en relación a su composición química y tamaño (Katsouyanni y cols., 1997; Pope y Dockery, 2006).

Se ha establecido entonces que la inducción de alteraciones fisiopatológicas en pulmones, corazón y vasculatura como consecuencia de la exposición a PM esta relacionada con la presencia de un estado general sistémico de inflamación y estrés oxidante (Figura 1) (Brauer, 2002; Pope, 2002, 2004, 2006; Schikowsky, 2006; Nording, 2008).

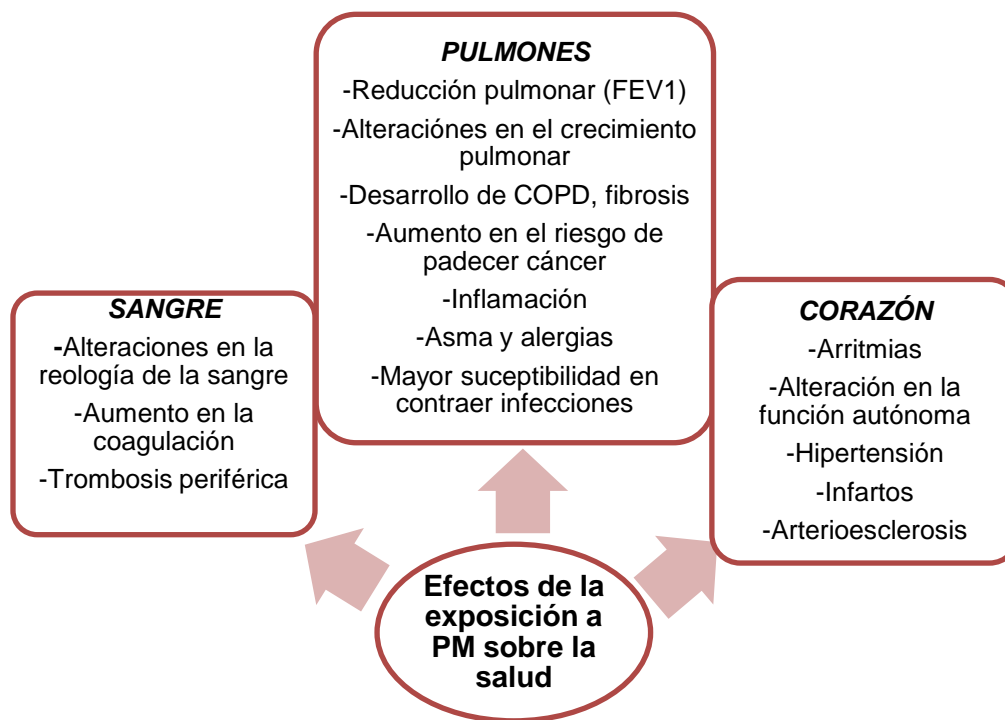


Figura 1. Asociación con la mortalidad de enfermedades cardiorespiratorias (Brauer, 2002; Pope, 2002, 2004, 2006; Schikowsky, 2006; Nording, 2008).

2.1 Estudios de exposición *in vivo* e *in vitro* a PM

Estudios *in vivo* en modelos animales también han demostrado al estrés oxidante como un modulador central de los efectos adversos producidos por la exposición a PM determinado por el tipo de componentes químicos de las PM. Un estudio en ratas Sprague-Dawley (SD) mostró que la exposición por un período corto (5 hr) a PM finas concentradas promueven la inducción significativa de estrés oxidante (lipoperoxidación) en pulmón y corazón así como de enzimas de la respuesta antioxidante de manera reversible, sugiriendo una capacidad adaptativa a la exposición aguda (Gurgueira y cols., 2002). Otro estudio en ratas SD expuestas por 4 horas durante 3 días consecutivos durante 3 semanas en el otoño y en el invierno a PM finas y ultrafinas concentradas en Fresno California mostró una disminución en la viabilidad y tipo de células del lavado broncoalveolar indistintamente de la época del año (Smith y cols., 2003). Contraponiéndose a lo observado *in vitro* dónde la época del año

en la que se colectan las PM influye en la inducción de efectos tóxicos, lo que sugiere una distinta respuesta tóxica dependiendo del modelo biológico utilizado.

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDANTE

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en estrés sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en estrés oxidante.

El término estrés oxidante abarca un amplio espectro de condiciones que alteran el estado celular redox y se define como la pérdida del balance natural del organismo entre las sustancias oxidantes y las sustancias antioxidantes a favor de las primeras, resultando en un incremento general de ERO a nivel intracelular (Betteridge, 2000).

El estrés oxidante se ha relacionado (ya sea como parte de o directamente como causal) en el desarrollo de enfermedades como el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Tao y cols., 2003), eventos genotóxicos y posible promoción de tumores (Knaapen y cols., 2004). Los efectos más importantes mediados por ERO estudiados hasta ahora comprenden: daño oxidante al ADN mediante la formación de aductos oxidados, carbonilación de proteínas por la reacción de ERO con lípidos estructurales de membrana, interferencia con los procesos reguladores del crecimiento y proliferación celular a través de la activación de rutas de señalización de MAP cinasas o PKC y activación de factores de transcripción que activan señales de muerte celular programada.

3.1 Mecanismos estrés oxidante inducido por PM

Diversos estudios *in vitro* han confirmado que el estrés oxidante es un proceso central que participa en la toxicidad por la exposición a PM. Se ha intentado establecer una correlación entre los componentes de PM y la inducción del estrés oxidante, sin embargo todos los componentes participan de diversas formas, los metales pueden inducirlo mediante la reacción de Fenton (Figura 2), contribuyendo así a la generación de estrés oxidante y daño celular por formación de malondialdehído (producto de la lipoperoxidación) y la muerte celular por apoptosis (Konigsberg., 2008). Así mismo los componentes orgánicos (COVs e HAPs) sufren transformaciones metabólicas (CP450 por ejemplo) que al generar quinonas u otros compuestos inducen la producción de ERO.

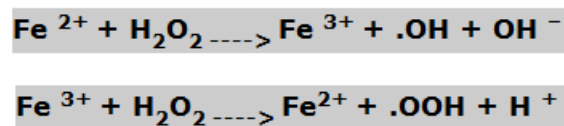


Figura 2. Reacción de Fenton

3.2 La exposición a PM, la inducción de estrés y daño oxidante

Un estudio en DNA y en células epiteliales de humano demuestra que el componente metálico de las PM es un importante generador de ERO que contribuye al daño oxidante (Prahalad y cols., 2001). Otros estudios utilizando modelos animales reportan la inducción de una respuesta inflamatoria y de daño oxidante pulmonar en ratas expuestas por instilación endotraqueal a polvo de carbón, ambas respuestas se vieron disminuidas a consecuencia de un tratamiento simultaneo con NAC (Pinho y cols., 2005). Las ERO generadas por PM pueden actuar como mediadores importantes de los efectos adversos provocados en los sistemas respiratorio y cardiovascular. Se han sugerido varios mecanismos de daño, que incluyen desde la capacidad de las PM de causar daño directo y

efectos indirectos debidos a la liberación de mediadores intracelulares por células estimuladas por las PM, hasta estimulación epitelial por el depósito de las PM en pulmones. Asimismo, las ERO producidas por PM, pueden desencadenar daños a las proteínas de los tejidos como la carbonilación, el cual es un daño oxidativo irreversible, ésta dado debido a las reacciones químicas que dan lugar a los grupos carbonilo por medio de una variedad de vías oxidativas. La generación de productos llamados especies reactivas de carbonilo (ERC), reaccionan con las proteínas, que a menudo conduce a una pérdida de la función de las proteínas, que es considerado como un indicador generalizado de grave daño oxidativo. Cuando las proteínas son moderadamente carboniladas, son degradadas por el sistema proteosomal, por el contrario, las proteínas que tiene un daño mayor, tienen a formar agregados de alto peso molecular que se resisten a la degradación y se acumulan de forma dañada y mal plegada. Tales agregados de proteínas pueden inhibir la actividad del proteosoma. Se ha estudiado la relación directa de la oxidación de las proteínas por ERO resultado de la oxidación de las cadenas laterales de lisina, arginina, prolina, treonina y residuos a través de la oxidación catalizada por metales (Stadtman y cols 1991). Un gran número de enfermedades degenerativas como Parkinson, Alzheimer, diabetes y cáncer, están directamente relacionadas con la acumulación de agregados resistentes a la proteólisis.

3.3 Respuesta antioxidante

Bajo condiciones normales las células son capaces de contrarrestar la producción de ERO a través de enzimas o moléculas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes con que dispone la célula son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S transferasa (GST) y proteínas de estrés con actividad enzimática como la hemoxygenasa 1 (HO-1). Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos están regulados por la presencia intracelular de moléculas como: glutatión (GSH), tiorredoxina (TRx), vitamina E, vitamina C y catequinas (Klaunig & Kamendulis 2004). A pesar de contar con un sistema antioxidante muy diverso la célula suele utilizar enzimas específicas o moléculas muy abundantes e inespecíficas como una primera línea de defensa. Es posible observar efectos jerárquicos con base en el nivel de estrés oxidante, de este modo a altos niveles de estrés oxidativo, se observan efectos pro-inflamatorios y citotóxicos, mientras que a niveles bajos de estrés oxidativo se activan las respuestas antioxidantes (Li y cols., 2003). Entre las moléculas antioxidantes enzimáticas se encuentran las superóxidos dismutasas (Cu/ZnSOD y la MnSOD), que protegen a la célula del daño oxidante al convertir a los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y a la CAT que previene la acumulación intracelular de H_2O_2 al degradarlo para formar $H_2O + O_2$. La expresión de la Cu/ZnSOD y de la CAT son constitutivas mientras que la expresión de la MnSOD es inducible por estrés oxidante (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Otros elementos importantes de la respuesta antioxidante involucrados en la regulación intracelular incluyen al elemento de la respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) que es una secuencia promotora activa tipo *cis* que tiene el papel de regular la activación transcripcional de genes para controlar el estado redox intracelular y así proteger a las células del daño oxidante. Las proteínas codificadas por la batería de genes ARE incluye

enzimas asociadas a la biosíntesis de GSH, que es una proteína redox con sitios activos sulfidrilo, enzimas metabolizadoras de fase II y proteínas de estrés inducibles como HO-1 (Otterbein y cols., 2000; Nguyen y cols., 2003; Ryter y cols., 2005). La HO-1 forma parte de un sistema enzimático que cataliza la oxidación del grupo hemo a biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe). La biliverdina es convertida a bilirrubina que es un potente antioxidante debido a que secuestra radicales lipido-peróxidos, el Fe/ferritina y el CO que tiene propiedades antiapoptóticas y antiinflamatorias, participando en la defensa celular. Asimismo la inducción de la HO-1 ha sido reportado como un elemento importante en contra de la inflamación pulmonar debido a la multiplicidad de estímulos asociados al estrés oxidante e inflamación que la inducen como la hipoxia, hiperoxia, citocinas, óxido nítrico, metales pesados, radiación ultravioleta, H₂O₂, sustancias tioles reactivas (Ryter y cols., 2002; Carter y cols., 2004).

A pesar de que se han establecido las vías fisiopatológicas generales de daño tóxico por la exposición a PM y se conocen algunos de los mecanismos moleculares que contribuyen al daño celular en modelos *in vitro*, se requiere profundizar en el papel que los oxidantes contenidos en PM juegan en la inducción del estrés y de las enzimas antioxidantes involucradas en modelos *in vivo*. En este contexto se propone evaluar en modelos experimentales (ratas) la respuesta antioxidante (niveles proteicos de HO-1) y el daño tóxico (carbonilación de proteínas) inducido en pulmón, así como analizar la relación que éstos elementos de la respuesta biológica tienen con respecto a la composición química de PM.

4. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del aire es un grave problema de salud pública que afecta a los habitantes de zonas urbanas. El material particulado suspendido en el aire es uno de principales factores que se han relacionado con el daño cardiopulmonar por la exposición a contaminantes en el aire. Se sabe que las PM pueden generar ERO las cuales pueden actuar como mediadores de daño tóxico en los sistemas respiratorio y cardiovascular. A pesar de que se han establecido las vías fisiopatológicas generales de toxicidad por la exposición a PM y se conocen algunos de los mecanismos moleculares que contribuyen al daño celular en modelos *in vitro*, se requiere profundizar en el potencial tóxico de oxidantes contenidos en diferentes tipos de PM y el papel que juegan en la inducción del estrés y de las enzimas antioxidantes involucradas, en modelos *in vivo*.

5. HIPÓTESIS

La exposición *in vivo* a PM distintas inducirá estrés oxidante lo que podría resultar en la inducción de hemoxigenasa y/o daño tóxico en el pulmón.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la respuesta antioxidante y el daño tóxico en el pulmón de ratas Sprague-Dawley expuestas a PM_{2.5}, PM₁₀, POLVO NIST 1649a y DEP por instilación endotraqueal a las 24 y 48 hr posteriores a la exposición.

6.2 Específicos

- Estandarizar la técnica de exposición a PM por instilación endotraqueal mediante una cánula flexible en ratas expuestas a PM.
- Evaluar la expresión de HO-1 mediante inmunodetección en tejido pulmonar de ratas expuestas a diferentes tipos de PM.
- Evaluar la carbonilación de proteínas mediante inmunodetección de ratas expuestas a diferentes tipos de PM.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño Experimental

Ratas Sprague/Dawley (SD) fueron expuestas en una sola administración por vía endotraqueal a una dosis única (5 mg/kg) a distintos tipos de PM. Se contó un grupo control expuesto a una solución fisiológica. A las 24 y 48 hr posteriores a la inoculación se llevó a cabo el sacrificio y se recolectaron los tejidos para la determinación de la respuesta antioxidante (niveles proteicos de HO-1) y el daño tóxico (carbonilación de proteínas) (Figura 3).

7.2 Preparación de la suspensión de PM

De cada uno de los modelos de partículas PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a y partículas de emisión de diesel (DEP), se pesaron en un frasco de vidrio un equivalente de 5 mg/kg, las cuales fueron suspendidas en Buffer de Fosfatos (PBS) 1 ml/kg y sonicadas mediante un SONICADOR ULTRASONICO (Ultrasonic Processor®) durante 10 minutos y finalmente etiquetadas para su reconocimiento. Las suspensiones se prepararon justo antes de la administración por IE.

7.3 Instilación endotraqueal

La técnica de instilación endotraqueal (IE), es un método que se ha utilizado para la realización de estudios encaminados a la evaluación tóxica de PM, con el objetivo de relacionar su composición química con su potencial tóxico en el tracto respiratorio, con la ventaja de observar los efectos en un intervalo de dosis (Costa y cols., 2001; Costa y cols., 2004). Otra aplicación potencial de la IE es comparar los efectos de un contaminante con

respecto a la inhalación de contaminantes presentes en el aire, la información obtenida con IE puede ser toxicológicamente pertinente debido al depósito de los contaminantes directamente en tracto respiratorio. Se han realizado pruebas y estudios comparativos, estos, son importantes para caracterizar tanto la dosis y los patrones de respuesta. (Driscoll y cols., 2000).

7.3.1 Procedimiento

La IE se realizó en ratas Sprague Dawley (SD) ♂ (n=5) a una dosis única de 5 mg/kg a 24 y 48 horas, mediante una cánula flexible de 16G y con una jeringa de 1 ml en una suspensión fisiológica a una concentración de 1mg/ml conteniendo:

- a. GRUPO 1 - Solución salina estéril 0.9% = Control
- b. GRUPO 2 - Polvo Urbano NIST 1649a en solución salina
- c. GRUPO 3 - Partículas suspendidas de aire ambiente de diámetro aerodinámico PM_{10} en solución salina = PM_{10}
- d. GRUPO 4 - Partículas suspendidas de aire ambiente de diámetro aerodinámico $PM_{2.5}$ en solución salina = $PM_{2.5}$
- e. GRUPO 5 - Partículas de emisión de diesel en solución salina = DEP

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y posteriormente inmovilizadas, se introdujo cuidadosamente la cánula flexible y se les inoculó la suspensión de las diferentes PM como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Instilación endotraqueal de ratas a diferentes tipos de PM.

7.4 Recolección de tejidos post-exposición

Las ratas no expuestas y expuestas PM se sacrificaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg peso) a las 24 y 48 horas post exposición. Posteriormente se obtuvo el tejido pulmonar y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de proteína para los análisis de inmunodetección.

7.5 Homogenado de tejido y extracción de proteína total

7.5.1 Procedimiento de la evaluación de la respuesta antioxidante (ver soluciones en Anexo)

Se colocó en un tubo de cristal para homogenado aproximadamente 1 cm^3 de pulmón, fue homogenado mediante un Politron (Wise Stire®) con buffer de extracción pH 7.5, e inhibidor de proteasas, posteriormente fue centrifugado a 12000 g durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalmente se decantó el sobrenadante y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación cuantitativa de proteína para la evaluación de la expresión de HO-1.

7.5.2 Procedimiento de la evaluación del daño tóxico (ver soluciones en Anexo)

Para la determinación de la carbonilación de proteínas, se colocó en un tubo de homogenado aproximadamente 1 cm³ de pulmón, fue homogenado con buffer de extracción/mercaptoetanol 2% pH 7.5, e inhibidor de proteasas, posteriormente fue centrifugado a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C, finalmente se decantó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta la determinación cuantitativa de proteína para la evaluación de la carbonilación de proteínas.

7.6 Determinación de proteína

Se utilizó el método de Brarford para la determinación de proteína, para esta técnica, se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible. Para determinar la concentración de proteína total presente en cada una de las muestras, se realizó la preparación de una curva de calibración empleando como proteína patrón seroalbúmina bovina BSA (Bradford, 1976).

7.6.1 Procedimiento para la determinación de proteína (ver soluciones en Anexo):

Se prepararon diluciones de una solución de BSA para realizar una curva de calibración a partir de la concentración stock de un 1mg/ml (Ver tabla en anexo). Se utilizaron 2 µl de diferentes diluciones del extracto proteico para determinar la concentración de proteína. Las muestras tanto para evaluación de la expresión de HO-1 y para la determinación de la

carbonilación de proteínas, se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250). El contenido de proteína de la muestra se calculó usando la curva de calibración de BSA. De acuerdo a las condiciones estandarizadas en la extracción de proteína, se usó una dilución 1:20 (proteína/buffer de fosfatos) para determinar la concentración de proteína en las muestras.

7.7 Electroforesis para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico

En esta técnica, la separación de las proteínas se lleva a cabo una vez que éstas han sido disociadas hasta su estructura primaria, desnaturalizándose con calor y agentes reductores. El detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) es usada para dar carga a las proteínas una vez que se une a éstas, y puesto que el número de moléculas unidas es proporcional al peso molecular del polipéptido e independiente a su secuencia, a migración y separación se lleva a cabo por la diferencia de tamaños. El sistema de gel discontinuo consiste en un gel concentrador (stacking gel) de alta porosidad y buffer de pH 6.8 (upper buffer), y un gel separador (resolving buffer), de menor porosidad y buffer de pH 8.7 (lower buffer), con propósito de crear un frente de corrida que concentra las muestras en la entrada al gel separador; una vez en ésta, el cambio de pH libera a la muestra de los iones de glicina y cloruro contenidos en el buffer, permitiendo la migración de los complejos SDS-polipéptido en una zona de pH y voltaje constantes para su separación por tamaño (Laemli, 1970).

7.7.1 Procedimiento para la preparación de la muestra para evaluación de la respuesta antioxidante (ver soluciones en Anexo):

Se tomó el volumen con un contenido de a 50 µg de proteína en cada muestra y se ajustaron todas las muestras al mismo volumen con buffer de fosfatos, se les agregó el mismo volumen de buffer de carga (loading buffer), se agitaron en vórtex y se desnaturalizaron en baño de agua a ebullición durante 3 minutos, se agitaron y se centrifugaron en una picocentrífuga (CLP®) durante 3 segundos para recuperar todo el volumen.

7.7.1.2 Preparación de la muestra para evaluación del daño tóxico (Oxy-Blot ®).

Se tomó un volumen equivalente a 15 ug de proteína; para derivatizar las proteínas, se les agregó 5 µm de SDS al 12%, 10 µl de dinitrofenilhidrazina (DNPH) y 10 µL de solución neutralizante para detener la reacción, para este caso, no se desnaturalizan las proteínas.

7.7.2 Separación electroforética para la evaluación de las respuestas antioxidante y daño tóxico.

Se tomó una alícuota de buffer de corrida 10x (para HO-1 y carbonilación respectivamente) y se diluyó para obtener una concentración final de 1x. Se colocó el gel en la cámara y se agregó el buffer de corrida 1x inundando los pozos del gel de poliacrilamida al 12%. Se cargó cada muestra de acuerdo al orden establecido, introduciendo la punta de la pipeta con la muestra en cada pozo y descargando lentamente para evitar que rebose. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente (TA) y amperaje constante de 0.05 mA (Fuente de poder Bio-Rad®), tomándose 100 minutos para la salida del frente de corrida.

7.8 WESTERN BLOT (Electrotransferencia) para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico.

Esta técnica consiste en transferir las proteínas separadas electroforéticamente del gel a un soporte fijo, en este caso, una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad) para poder ser detectado con anticuerpos específicos para la proteína de interés (Kistler y cols 1984).

7.8.1 Procedimiento para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico (ver soluciones en Anexo):

Se tomó una alícuota de buffer de transferencia 10x y se diluyó para obtener una concentración final de 1x con metanol al 20%. Las proteínas fueron electrotransferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda (Bio-Rad). Concluida la electroforesis, el gel se lavó primero con agua desionizada y posteriormente se equilibró 20 minutos con buffer de transferencia 1x. La membrana de nitrocelulosa, se activó sumergiéndola con buffer de transferencia 1x. Posteriormente se colocaron los filtros en el sándwich (empapados de buffer de transferencia 1x) y encima de estos el gel, el sándwich se cerró y se colocó en la cámara, la cual contenía 500 ml de buffer de transferencia 1x, así mismo la cámara se montó en una tina con hielo. La electrotransferencia se realizó a 95 Volts durante 1 hora.

7.8.2 Procedimiento para la inmunodetección para la evaluación de la respuesta antioxidante (ver soluciones en Anexo):

Posteriormente, la membrana se lavó con PBS y se bloqueó durante 1 hora con solución de PBS y leche descremada al 3%. Después se incubó con el anticuerpo primario para HO-1 en PBS-tween 20% (1:250) durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, la membrana

se lavó 2 veces durante 10 minutos con solución de lavado PBS-tween y se agregó el anticuerpo secundario (1:1000) durante 1 hora. La membrana se lavó nuevamente con PBS-tween 20% 3 veces durante 10 minutos y se lavó finalmente con PBS 2 veces durante 10 minutos. La membrana se dejó 2 minutos con la solución de quimioluminiscencia (luminol) y se le retiró el exceso, se colocó entre dos películas plástico y se fijó en el cassette de exposición. En el cuarto oscuro, utilizando la lámpara de seguridad, se manipuló y se expuso una película radiográfica a la membrana dentro del cassette durante 3 minutos, posteriormente se retiró del cassette y se sumergió la película en una charola conteniendo solución reveladora, se enjuagó con agua y se introdujo en otra charola conteniendo solución fijadora, finalmente se enjuagó y se secó.

Los anticuerpos, materiales y soluciones se indican en el Anexo.

7.8.3 Procedimiento para la Inmunodetección para la evaluación del daño tóxico (OxyBlot™):

Posteriormente la membrana fue lavada con PBS y bloqueada con 1% de BSA en PBS-Tween durante 1 h, posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-DNP por 1 h (1:200). Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20% y se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo (1:300) en PBS-Tween 20%, proporcionando en el estuche del ensayo.

7.9 Análisis densitométrico para evaluación de la respuesta antioxidante y daño tóxico.

La imagen de la película fue capturada y digitalizada con un software para el análisis densitométrico de cada banda (*Image J*). El análisis se hizo corrigiendo las bandas de cada carril con la banda de β -actina como control de carga.

7.10 Métodos estadísticos y análisis de datos

Determinación de diferencias significativas entre condiciones control y de exposición, y la relación entre los efectos tóxicos evaluados (*Aplicación la prueba t student utilizando el paquete estadístico SIGMASTAT 3.1*).

8. RESULTADOS

En el presente trabajo se utilizaron cuatro diferentes tipos de material particulado: PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a y DEP, las cuales fueron inoculadas a ratas SD mediante instilación endotraqueal, a una dosis única de 5 mg/kg (1ml/kg). Las ratas fueron sacrificadas después de 24 y 48 hr. Se evaluó la expresión de HO-1 y la carbonilación de proteínas en tejido pulmonar mediante inmunodetección, como biomarcadores de respuesta antioxidante y daño oxidativo respectivamente.

8.1 Expresión de HO-1 después de la exposición a diferentes tipos de PM.

A las 24 hr después de la exposición a diferentes tipos de material particulado, no se observaron diferencias en la expresión de HO-1 en tejido pulmonar con respecto al control. Los extractos proteicos fueron analizados mediante inmunodetección. En la Figura 1, se muestra: A) Imagen representativa del ensayo de Western blot de la expresión de HO-1 a las 24 hr post exposición y B) Análisis por densidad óptica de la imagen de Western blot (n=5, por duplicado) expresada en unidades relativas.

A las 48 hr después de la exposición, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de HO-1 en tejido pulmonar en los grupos tratados con PM_{2.5} y PM₁₀, POLVO NIST 1649a, sin embargo, existe incremento en los niveles proteicos de HO-1 con el grupo instilado con DEP, este incremento fue estadísticamente significativa con respecto al control. Los extractos proteicos fueron analizados mediante inmunodetección. En la Figura 2, se muestra: A) Imagen representativa del ensayo de Western blot de la expresión de HO-1 a las 48 hr post exposición y B) Análisis por densidad óptica de la imagen de Western blot (n=5, por duplicado) expresada en unidades relativas.

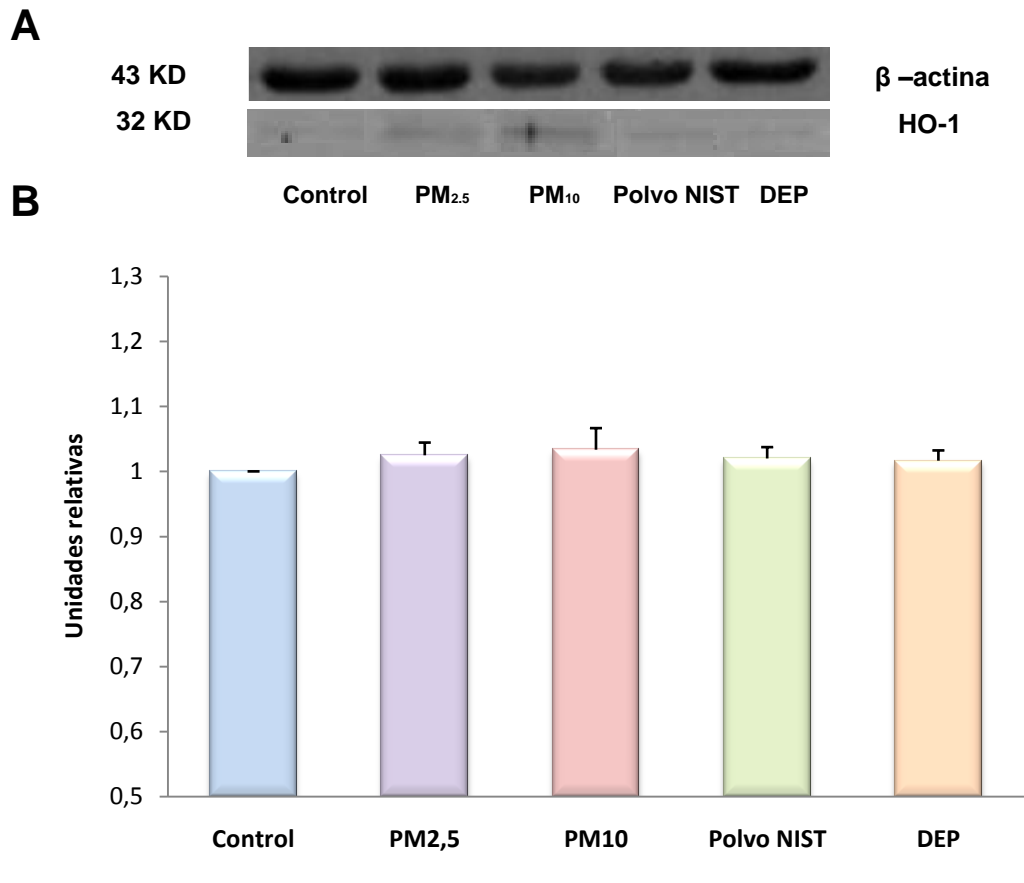


Figura 5. Inmunodetección de HO-1 en pulmón de rata (A) Imagen representativa de la expresión de HO-1 después de 24 h de exposición a solución salina (control) y PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a y DEP. (B) Análisis densitométrico de HO-1 en pulmón de rata expresadas en densidad óptica. Las barras presentan la media de n = 5 (por duplicado) ± SD. No se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de HO-1 en comparación con el grupo control.

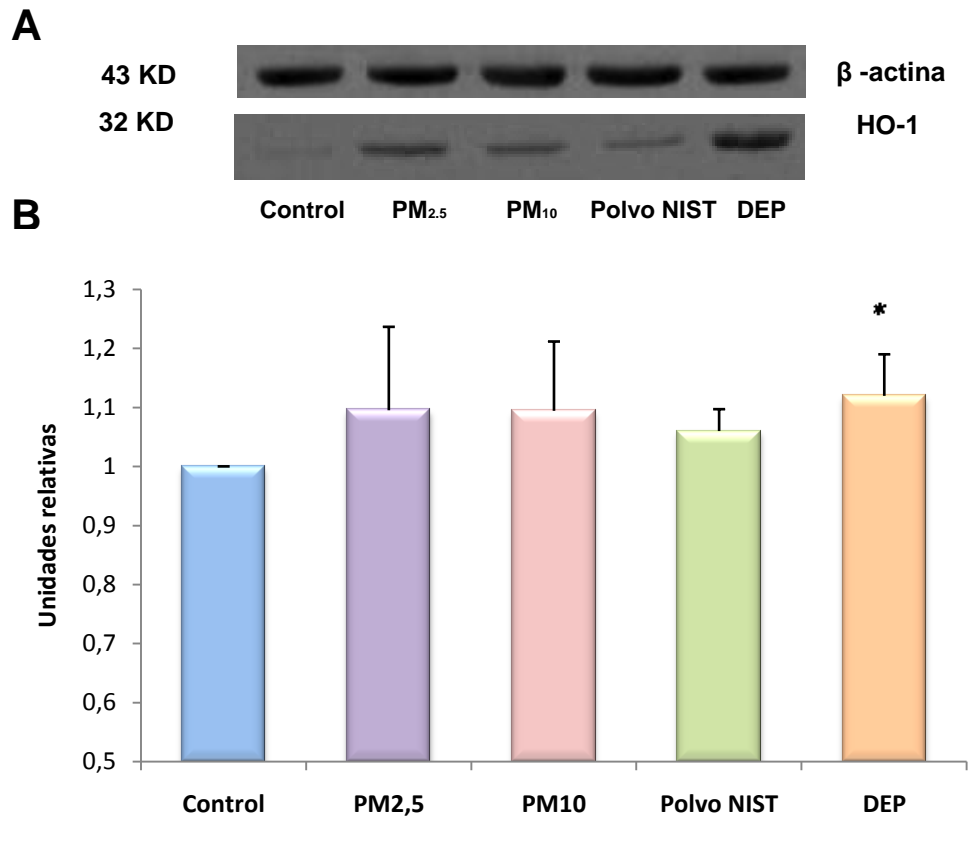


Figura 6. Inmunodetección de HO-1 en pulmón de rata (A) Imagen representativa de la expresión de HO-1 después de 48 h de exposición a solución salina (control) y PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a, y DEP. (B) Análisis densitométrico de HO-1 en pulmón de rata expresadas en densidad óptica. Las barras presentan la media de una n =5 (por duplicado) \pm SD. * p <0,05 prueba t de Student. Se observó un aumento estadísticamente significativo con en el grupo expuesto a DEP en el aumento de los niveles de proteína de HO-1 en comparación con el grupo control.

8.2 Carbonilación de proteínas después de la exposición a diferentes tipos de PM.

A las 24 horas de exposición no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la oxidación proteica del tejido pulmonar de las ratas expuestas, con ningún tipo de PM. En la Figura 3, se observa: A) Imagen representativa del ensayo de Western blot de la carbonilación de proteínas a las 24 hr post exposición y B) análisis por densidad óptica de la imagen de Western blot expresada en unidades relativas.

A las 48 horas de exposición se observó un incremento en la carbonilación de proteínas en con los tipos de PM, siendo las PM_{2.5} y PM₁₀ las partículas que mostraron tener una mayor capacidad de oxidar proteínas en el mayor número de animales por grupo. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la oxidación proteica en tejido pulmonar de rata, con ninguna tipo de PM.. En la Figura 4, se observa: A) Imagen representativa del ensayo de Western blot de la carbonilación de proteínas a las 48 hr post exposición y B) análisis por densidad óptica de la imagen de Western blot expresada en unidades relativas.

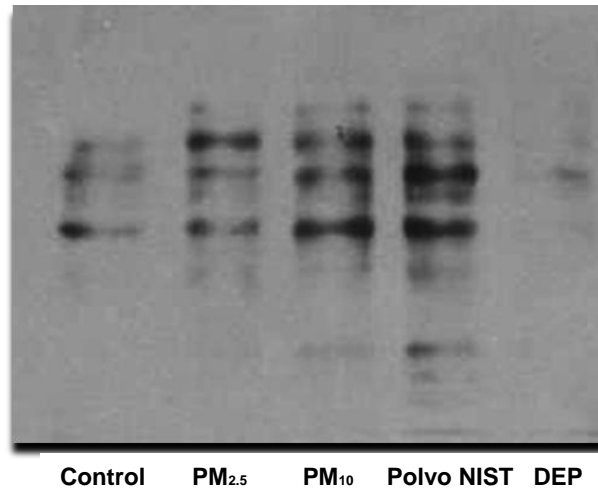
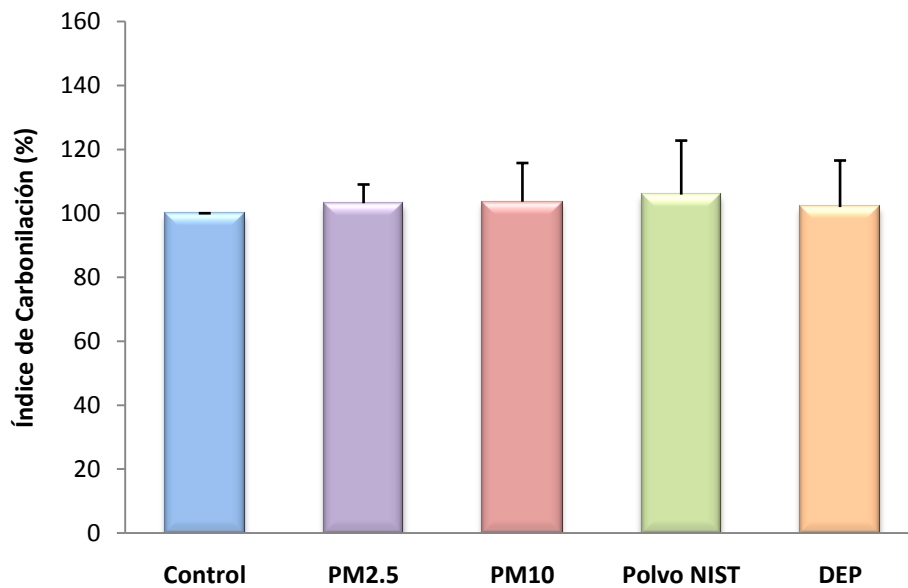
A**B**

Figura 7. (A) Carbonilación de proteínas (inmunodetección) después de 24 h de exposición a solución salina (control), PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a, y DEP. La imagen es representativa de n = 3. (B) Análisis densitométrico de oxidación de proteínas en pulmón de rata expresadas en densidad óptica. Las barras presentan la media de n = 3 ± SD. No se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

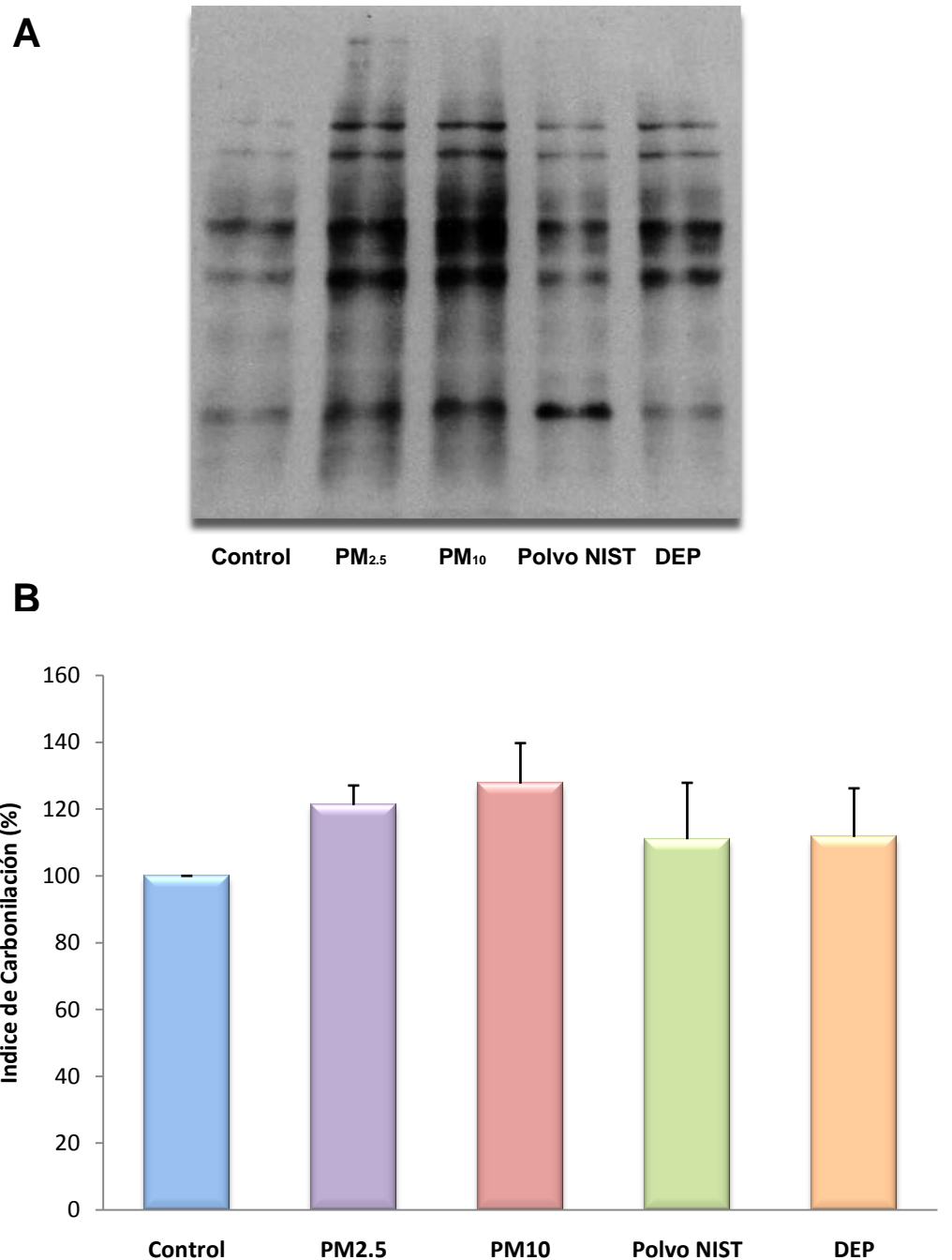


Figura 8. (A) Carbonilación de proteínas (inmunodetección) después de 48 h de exposición a solución salina (control), PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a, y DEP. La imagen es representativa de n = 3. (B) Análisis densitométrico de oxidación de proteínas en pulmón de rata expresadas en densidad óptica. Las barras presentan la media de n = 3 ± SD. No hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, a pesar de que se produjo la carbonilación de proteínas por la exposición a PM.

En el presente trabajo no se observó incrementos en la expresión de HO-1 a las 24 hr de exposición a PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649a, y DEP. Sin embargo a las 48 horas de exposición, se observó un incremento significativo sólo con DEP en la expresión de HO-1. Para carbonilación de proteínas, no se evidenció oxidación de proteínas a las 24 ni a las 48 hr. Es importante mencionar que hubo inconsistencia en la expresión de HO-1 y de carbonilación en cada una de una de las ratas que conformaban el grupo, lo cual reflejó dispersión de los datos, sobre todo a las 48 hr, lo que se evidenció en los resultados presentados.

9. DISCUSIÓN

Debido a su tamaño aerodinámico, las PM tienen la capacidad de penetrar en las vías respiratorias profundas, e inducir estrés oxidante, y en los últimos años se ha demostrado que la composición química y la naturaleza de las PM es muy importante en la inducción de efectos biológicos por la capacidad que tienen para inducir la generación de ERO (Environmental Toxicants, 2009).

Para conocer más sobre los mecanismos implicados en la inducción de efectos mediante los cuales las PM inducen estrés oxidante y la capacidad del organismo para defenderse, en este trabajo se evaluó la respuesta antioxidante (HO-1) y el daño tóxico (carbonilación de proteínas) a las 24 y 48 horas post exposición, en pulmón de ratas expuestas a PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a y DEP por medio de instilación endotraqueal (IE), con el propósito de estudiar la toxicidad inducida a una dosis única por los diferentes modelos químicamente distintos de PM.

9.1 Respuesta antioxidante

Evidencias sugieren que el estrés oxidativo juega un papel central en la patogénesis de muchas enfermedades pulmonares, incluida la dificultad respiratoria, enfisema, asma, displasia broncopulmonar, y fibrosis pulmonar intersticial. Se ha estudiado el papel de las enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GSH-Px, en la mediación de la resistencia de los pulmones frente a la lesión pulmonar inducida por estrés oxidante. Sin embargo, otras moléculas pueden jugar un papel vital de defensa en el pulmón y / o como respuesta de protección al estrés oxidativo, la enzima de estrés, HO-1 es la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo y da lugar a tres productos fundamentales: biliverdina, el hierro libre y el monóxido de carbono. La inducción de la HO-1 está acompañada además

por la síntesis de ferritina, la cual secuestra el Fe y como consecuencia, se produce una disminución en los niveles del Fe libre en sangre, un agente pro-oxidante que puede provocar apoptosis o daño en varios órganos y tejidos, por lo tanto se reduce el potencial catalítico de las reacciones oxidativas (Fang y cols., 2004).

Se ha demostrado que la inducción de HO-1 en tejido pulmonar *in vitro* e *in vivo* responde a procesos de estrés oxidativo e inflamación en las vías aéreas como consecuencia de la hiperoxia, hipoxia, endotoxemias y exposición a contaminantes (Lee y cols., 2000; Otterbein y cols., 2000) por lo que, tanto la HO-1 como sus productos, desempeñan un papel importante en la modulación del funcionamiento de las vías aéreas en condiciones patológicas.

En este trabajo se decidió medir la expresión de esta enzima como un parámetro de respuesta antioxidante en tejido pulmonar por el daño inducido por la exposición a diferentes tipos de PM urbanas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que no hubo inducción en la expresión de la HO-1 con ningún tipo de PM a las 24 horas post-exposición a una dosis única de 5 mg/kg de PM. Por otro lado, a las 48 hr post-exposición, se observa un incremento estadísticamente significativo por la exposición a DEP a una dosis única de 5 mg/kg de PM.

A las 24 hr no observamos inducción de HO-1 por la exposición a PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a y DEP debido a que es probable que aún no se desencadena la respuesta, ya que la expresión de HO-1 está relacionada directamente con la duración de la exposición y la concentración de PM. Se ha reportado que la expresión de la HO-1 de en los pulmones de ratas Wistar macho a las cuales se les administró 1 mg y 2 mg de sílice cristalina en suspensión en solución salina por una IE en dosis única y se sacrificaron a las 3 días, 1 semana, 1 mes, 3 meses y 6 meses post exposición. Estos experimentos mostraron que los

niveles de HO-1 se incrementaron en comparación con los controles a los 3 días y desde 1 mes a 6 meses post-exposición después de la IE de 2 mg de sílice cristalina. Por otro lado los niveles de HO-1 se incrementaron en comparación con los controles desde 1 mes a 6 meses después de la IE de 1 mg de sílice cristalina (Nagamoto y cols., 2006), por lo que el tiempo de inducción fue dependiente del tiempo y de la concentración, con una probable influencia de las características fisicoquímicas de la sílice cristalina ya que puede variar el área de superficie disponible para interactuar con la superficie celular.

Por otro lado, la expresión de HO-1 no es estadísticamente significativa con respecto al control a las 48 hr post exposición en ratas expuestas a PM_{2.5}, PM₁₀ y Polvo NIST, esto puede deberse en gran medida a la exposición única realizada y puede también depender de la composición química de estas. La constitución química de PM_{2.5} y PM₁₀ son diferentes, PM_{2.5} es especialmente rica en compuestos semivolátiles por ejemplo, nitrato de amonio, compuestos orgánicos y metales (Co, Cu, Mn, Fe, Ni, Zn, Cd, Hg, Pb). Las PM₁₀ están compuestas principalmente por compuestos inorgánicos como silicatos y aluminatos, metales pesados entre otros, y material orgánico asociado a partículas de carbono. El otro modelo utilizado para esta evaluación fue el Polvo NIST 1649a, el cual consta de PM de un intervalo de 10 a 100 µm de diámetro aerodinámico, su constitución química es muy variada ya que contiene compuestos como: alifáticos, hidrocarburos, y principalmente metales como Va, Cu, Fe, As, Ni y Cd (Vega y cols., 2002; NIST 2009). Aunque algunos de los compuestos de las PM antes descritas son similares, la concentración de éstos en las PM varía y probablemente no hubo suficiente para estimular la expresión de la HO-1. La membrana celular y las enzimas son los lugares diana más importantes para la adsorción de los metales; en la primera se fijan sobre la superficie externa por ligandos esenciales y afectan tanto los fenómenos de permeabilidad, como el funcionamiento normal de las

enzimas implicadas en el transporte activo de numerosos constituyentes, el desarrollo de la acción tóxica de los metales, puede considerarse una afectación de la estructura celular, o de la alteración de la función celular (Repetto., 1988). Diversos metales se introducen en las membranas o en el interior de las células modificando su constitución; reaccionando con sus constituyentes o intercambiándose con elementos que cumplen funciones fisiológicas (litio por potasio, plomo por calcio) de todo lo cual se derivan alteraciones de la función e incluso la inducción de muerte celular. Por otro lado muchos elementos establecen una clara competencia con los metales esenciales por los sitios específicos de las proteínas desplazándolos de las metaloenzimas, coenzimas y sustratos. Esta interferencia se debe generalmente a la unión con los grupos sulfhidrilos (SH). La formación de mercaptanos o grupos tioles por la exposición a metales, se altera la funcionalidad de proteínas y enzimas esenciales en la respiración celular; consecuentemente se afecta el proceso de fosforilación oxidativa de la membrana mitocondrial y por tanto la activación del oxígeno, alterando el trabajo osmótico y mecánico celular (Environmental Toxicology., 2009).

Se ha demostrado, que la exposición a metales inhibe irreversiblemente a las enzimas SOD y GSH-Px, involucradas en la respuesta antioxidante y como consecuencia inmediata se presenta la intervención de éstas en la peroxidación lipídica de la membrana celular. Esta intervención es posible realizarla en forma directa, ya que los metales participan en mecanismos de la generación de ERO, principalmente los que contienen electrones desapareados que pueden ser aceptados por la molécula de oxígeno y generar radicales hidroxilo. Se ha reportado que la inducción de HO-1 por metales como: Co, Cu, Mn, Fe, Ni, Zn, Cd, Hg, Pb y que pueden estar presentes en las PM, con influencia sobre la síntesis y degradación de metaloporfirinas que controla, mediante una inicial represión del ácido gamma-aminolevulínico sintetasa (ALA-S) y posteriormente la inducción de HO-1. De tal

manera que lo que podría haber ocasionado que la HO-1, no se expresara con $PM_{2.5}$, PM_{10} y Polvo NIST 1649a, fue la intervención previa de la ALA-S a tiempos cortos (24 hr post-exposición) a la expresión de HO-1.

Por otro lado en el presente trabajo se observa que a las 48 hr de exposición, hay un incremento en la expresión de HO-1 con los distintos tipos de PM, sin embargo excepto por la exposición a DEP la expresión fue inconsistente por lo que sólo en el grupo administrado con DEP la expresión de HO-1 fue estadísticamente significativa con respecto al control. El resultado anterior muestra la activación de la respuesta antioxidante por parte de la HO-1 para proteger el tejido pulmonar, debido a ERO ocasionados por la exposición a DEP. Se ha reportado que los compuestos químicos contenidos en DEP son esencialmente de origen orgánico, se han identificado, por ejemplo hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) de los cuales los pirenos, fenantrenos y antracenos son compuestos que participan en la inducción de la respuesta antioxidante (Boland y cols 2000; Bonvallot y cols., 2001) y son algunas de las especies involucradas en el potencial tóxico de las DEP (Ichinose y cols 2005). Bauling y colaboradores (2003), reportaron que las principales familias de compuestos orgánicos en la superficie de DEP que se absorben con mayor facilidad son los PAH y las quinonas, ya que se encuentran más biodisponibles y son más rápidamente metabolizados por el citocromo P450 (CYP450), lo que genera metabolitos electrofílicos y reactivos incluyendo a las ERO. Por su parte Han y colaboradores (2001) reportaron que los compuestos orgánicos contenidos en la superficie de las DEP, tienen la capacidad de generar rápidamente ERO, mediante la técnica de resonancia paramagnética utilizando la espectroscopia no invasiva y una membrana de la sonda nitroxilo impermeable detectaron la presencia de radicales hidroxilo, singulete de oxígeno y anión superóxido en ratones por IE administrando 4 mg/kg de DEP. La acción tóxica de los compuestos orgánicos presentes

en DEP, está relacionada con la forma en que pueden interactuar con el sistema respiratorio debido a que los sistemas enzimáticos pueden producir metabolitos electrofilicos y generadores de estrés oxidante (Hirohisa y cols., 2006). Esto es especialmente importante cuando las PM son introducidas a las vías respiratorias; el mecanismo de acción de los compuestos orgánicos contenidos en las DEP ejercen su acción mediante el contacto y atacan a las células pulmonares por debilitamiento o disrupción de las membranas celulares lo que, a su vez, está directamente relacionado con el tiempo y el periodo de exposición, por lo que a dosis repetidas, la expresión de HO-1 es más evidente por la exposición a PM. Se ha demostrado que puede ocurrir la inducción de HO-1, en tejidos pulmonares de rata, en células epiteliales respiratorias, fibroblastos, células endoteliales y fundamentalmente en macrófagos alveolares (Sánchez y cols., 2009).

Si consideramos que las PM inoculadas en el presente estudio fueron en una sola administración es relevante mencionar la significancia de la expresión de HO-1 con DEP. Por lo que nuestros datos sugieren, que la inducción de HO-1 puede variar considerablemente debido a la composición y características físicas de PM.

9.2 Carbonilación de proteínas.

No se observó carbonilación de proteínas con la exposición a ningún tipo de PM a las 24 hr post-exposición, mientras que a las 48 hr post-exposición se puede observar carbonilación de proteínas con todos los tipos PM, no obstante fue heterogéneo en los animales de cada grupo. Por lo que asumimos que la oxidación de las proteínas a las 24 horas no se presenta daño a la exposición. La oxidación de las proteínas específicas constituye un útil biomarcador de la aparición de la lesión tisular, y por lo tanto pueden proporcionar evidencias sobre los mecanismos responsables por los cuales las PM pueden causar daño pulmonar.

Aunque nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni a las 24 ni a las 48 hr de exposición, existe una tendencia de daño proteico para cada una de las PM a las 48 hr de exposición, en donde se puede observar que PM_{2.5} y PM₁₀ actúan como mayores oxidantes de proteínas con respecto al control. Se ha reportado que las proteínas son atacadas primero por las ERO antes que el material genético y los lípidos, ya que son el componente principal de la mayoría de los sistemas biológicos, además las proteínas pueden interaccionar con un 50 a 75% de los radicales libres (Davies y cols., 1999). Se ha demostrado que existe una relación directa de la oxidación de las proteínas y ERO en donde la oxidación es regulada por metales, lo que nos hace suponer que las PM_{2.5} y PM₁₀, por su mayor contenido metálico con respecto a DEP, actúan como mayores oxidantes formando productos agregados que pueden interrumpir en un tiempo de exposición largo, la actividad del proteosoma, interfiriendo en la proteólisis y ocasionar a largo plazo, daños a nivel tisular debido al daño protesómico (Requena y cols., 2001).

En el contexto de la composición química, las partículas PM pueden tener una composición fisicoquímica homogénea o estar constituidas por diversos compuestos orgánicos e

inorgánicos como se describió anteriormente. Esto es muy importante con respecto a la carbonilación proteica, debido a que estos componentes químicos dañan la permeabilidad de las membranas celulares pulmonares, en donde los metales pesados pueden interactuar con otras moléculas como transportadoras de iones, producir especies radicales de carbonilo (ERC). Estudios anteriores indican que proteosomas y lisosomas son los principales organelos que participan en la degradación de ERC en células (Bernhard y cols 2007). Las ERC pueden formar agregados que al unirse con proteínas dañan los aminos terminales de las proteínas principalmente prolina, arginina y lisina, por lo que en el presente trabajo, se observó como una mayor tendencia a oxidar las proteínas PM_{2.5} y PM₁₀ con respecto a DEP (Figura 9).

En referencia a los análisis realizados en este estudio para evaluar la respuesta antioxidante con la expresión de HO-1, es posible que el aumento en los niveles de carbonilación tenga como consecuencia, una menor actividad de los sistemas de defensa antioxidante (Ji et al, 1990; Sohal et al, 1995) por lo que la HO-1 no es inducida a las 48 hr post exposición con PM_{2.5} PM₁₀ y Polvo NIST.

En la presente evaluación, no observamos resultados homogéneos en la expresión de HO-1 ni en carbonilación proteica con cada una grupo de las distintas PM, teniendo diferentes respuestas, lo que probablemente influyó en la dispersión de los datos, esto puede deberse a la respuesta en cada grupo. Se ha estudiado que el estrés oxidativo predice que un debilitamiento de la defensa antioxidante puede incrementar la susceptibilidad. Esto podría explicar porque algunas ratas fueron más propensas a experimentar efectos adversos por la exposición a las PM que otras en quienes los mecanismos antioxidantes fueron más eficientes (Nelson y cols., 2003).

En esta evaluación es importante mencionar la relevancia de los hallazgos encontrados, debido a la matriz de diferentes tipos de PM, lo que evidencia la capacidad que tienen estas para provocar daño tóxico en una sola exposición.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se diferenci6 el potencial t6xico de las PM con diferentes caracter6sticas fisicoqu6micas, siendo relevantes los hallazgos debido a que fue una sola administraci6n a tiempos cortos por instilaci6n endotraqueal. Nuestros datos sugieren que la influencia de las caracter6sticas fisicoqu6micas determina la inducci6n de HO-1 y de la carbonilaci6n de prote6nas. Se evidenci6 a las DEP como las PM con mayor potencial de inducir a la HO-1 a las 48 hr post exposici6n posiblemente debido a su origen org6nico, en contraste con lo observado con PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a que no indujeron a HO-1. En DEP no se observ6 carbonilaci6n, sin embargo las PM_{2.5}, PM₁₀, Polvo NIST 1649^a se presentaron como las m6s oxidantes con respecto a DEP probablemente debido a la interacci6n de los metales con las prote6nas del tejido pulmonar. Desde la perspectiva del tiempo y n6mero de exposiciones, ser6a de gran ayuda las evaluaciones de la inducci6n de HO-1 y determinaci6n de la carbonilaci6n de prote6nas a tiempos m6s largos y exposiciones repetidas, con el objetivo de seguir la tendencia de da6o oxidante comparando el potencial t6xico de los diferentes tipos de PM.

Por lo que concluimos que las interacciones bioqu6micas entre los componentes qu6micos de diferentes tipos de PM, influyen en el potencial de la respuesta antioxidante y el da6o oxidativo.

11. REFERENCIAS

1. Arriaga-Colin J. L., West J.J., Sosa G., Escalona S.S., Ordúñez R.M., Cervantes A.D.M. 2004. Measurements of VOCs in Mexico City (1992-2001) and evaluation of VOCs and CO in the emissions inventory. *Atmospheric Environment* 38: 2523-2533.
2. Baeza-Squiban A, Bonvallet V, Boland S, Marano F. 1999. Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors. *Cell Biol Toxicol.* 15(6):375-80.
3. Balásházy I, Hofmann W, Heistracher T. 2003. Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *Journal of Applied Physiology.* 94: 1719-25.
4. Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Sep;285(3):L671-9. Epub 2003 May 2.
5. Betteridge, D. J. 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism* 49: 3-8.
6. Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Jan;278(1):L25-32.
7. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Oct;25(4):515-21.
8. Brauer M, Hoek G, Van Vliet P, Meliefste K, Fischer PH, Wijga A, Koopman LP, Neijens HJ, Gerritsen J, Kerkhof M, Heinrich J, Bellander T, Brunekreef B. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Oct 15;166(8):1092-8.
9. California Environmental Protection Agency. Proposed Identification of Diesel Exhaust as a Toxic Air Contaminant. Prepared by the Staff of the Air Resources Board and the Office of Environmental Health Hazard Assessment. Los Angeles, CA, 1998.

10. Centers for Disease Control. National Institute for Occupational Safety and Health. Carcinogenic Effects of Exposure to Diesel Exhaust. NIOSH Current Intelligence Bulletin 50, Publication Nº 88-116. Atlanta, GA: CDC, 1998.
11. Carter E.P., Garat C., Imamura M. 2004. Continual emerging roles of HO-1: protection against airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287: L24-L25.
12. Churg A., Zay K., Li K. 1997. Mechanisms of mineral dust-induced emphysema. *Environ Health Perspect* 105(suppl 5): 1215-1218.
13. Comisión de Cooperación Ambiental (CCA). Salud Infantil y Medio Ambiente en América del Norte. Canadá, 2006.
14. Environmental Toxicants: Human Exposures and Their Health Effects - Página 551-600 de Morton Lippmann - 2009.
15. Fang, J., T. Akaike & H. Maeda (2004) *Apoptosis*9: 27-35.31. Lee, P.J., S.L. Camhi, B.Y. Chin, J. Alam & A.M. Choi (2000) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L175-82.
16. García Lozada Héctor Manuel. Evaluación del riesgo por emisiones de partículas en fuentes estacionarias.2006. Páginas 7-20
17. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B. 2002. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. Environ Health Perspect. Aug;110(8):749-55. .
18. Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3d Edition. Oxford University Press. Pp. 105.
19. Han WG, Noodleman L. Structural Model Studies for the High-Valent Intermediate Q of Methane Monooxygenase from Broken-Symmetry Density Functional Calculations. *Inorganica Chim Acta.* 2008 Mar 3;361(4):973-986.
20. Hirohisa T., Rie Y., and Ken-ichiro I. Components of Diesel Exhaust Particles Diversely Enhance a Variety of Respiratory Diseases Related to Infection or Allergy: Extracted Organic Chemicals and the Residual Particles after Extraction Differently Affect Respiratory Diseases. Received October 6, 2006; Accepted October 24, 2006
21. Jank B, Habermann B, Schweyen RJ, Link TA. PMP47, a peroxisomal homologue of mitochondrial solute carrier proteins.

- Trends Biochem Sci. 1993 Nov;18(11):427-8. Review. No abstract available. PMID: 8291088
22. Ichinose T , Furuyamaand A., Sagai M.. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). II. Acute toxicity of DEP introduced into lung by intratracheal instillation
 23. Jiménez B. E., La contaminación ambiental en México - Página 399 - 2002
 24. Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ. 1997. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. Chem Res Toxicol. Oct;10(10):1104-1108.
 25. Katsouyanni, K. Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, Rossi G, Wojtyniak B, Sunyer J, Bacharova L, Schouten JP, Ponka A, Anderson HR. 1997. Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from times series data from the APIIEA project--A European Approach. British Medical Journal 314: 1658-1663.
 26. Katsouyanni K. 2003. Ambient air pollution and health. British Medical Bulletin. 68: 143-156.
 27. Kiang, J. G. y Tokos, G. C. Heat shock protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. Pharmacol. Ther., 80:183-201. 1998
 28. Klaunig, J. E. & Kamendulis LM. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 44: 239-267.
 29. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. Int J Cancer. 109: 799-809.
 30. Lee JT, Son JY, Cho YS. .A comparison of mortality related to urban air particles between periods with Asian dust days and without Asian dust days in Seoul, Korea, 2000-2004. Environ Res. 2007 Nov;105(3):409-13. Epub 2007 Jul 20.
 31. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. 2003. "Ultrafine particle pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage." Environmental Health Perspectives 111(4): 455-460.
 32. Mossman B.T. 2000. Mechanisms of action of poorly soluble particulates in overload-related lung pathology. Inhalation Toxicology 12: 141-148.

33. National Institute of Standards and Technology The National Institute of Standards and Technology is a federal technology agency that develops and promotes measurement, standards, and technology. www.nist.gov/index.html
34. Nagatomo H, Morimoto Y, Oyabu T, Hirohashi M, Ogami A, Yamato H, Kuroda K, Higashi T, Tanaka I. Expression of heme oxygenase-1 in the lungs of rats exposed to crystalline silica. *J Occup Health*. 2006 Mar;48(2):124-8.
35. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. 2001. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med*. 7(1):20-6.
36. Nel A. 2005. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science*. 308(5723): 804-6.
37. Nelson JL, Bernstein PS, Schmidt MC, Von Tress MS, Askew EW. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older humans. *Oct;133(10):3117-23*. PMID: 14519794 2003.
38. Nguyen T., Sherratt P.J., Pickett C.B. 2003. Regulatory Mechanisms controlling gene expresión mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 43: 233-260.
39. Otterbein LE, Choi AM. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279: L1029-37.
40. Pinho RA, Silveira PC, Silva LA, Luiz Streck E, Dal-Pizzol F, F Moreira JC. 2005 N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res*. 99: 355-60.
41. Pope III C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K., Thurston G.D. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 287: 1132-41.
42. Pope III C.A., Burnett R.T., Thurston G.D., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Godleski J.J. 2004. Cardiovascular Mortality and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution. Epidemiological Evidence of General Pathophysiological Pathways of Disease. *Circulation*. 109:71-77.

43. Pope CA III. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? Environ Health Perspect. 2000 Aug;108 Suppl 4:713-23.
44. Pope III C.A. y Dockery D.W. 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 56: 709-742.
45. Prahalad A.K., Inmon J., Dailey L.A., Madden M.C., Ghio A.J., Gallagher J.E. 2001. Air pollution particles mediate oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cell in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 879-887.
46. Repetto M. *Toxicología Avanzada* Editado Montoro Food Science and Technology International .1996; 2: 53-54
47. Requena JR, Groth D, Legname G, Stadtman ER, Prusiner SB, Levine RL. Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa(29-231) prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7170-5. Epub 2001 Jun 12.
48. Ryter S.W., Otterbein L.E., Morse D., Choi A.M. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathway: regulation and functional significance. *Mol. Cell Biochem.* 234-235: 249-263.
49. Ryter SW, Choi AM. 2005. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal.* 7: 80-91.
50. Sánchez C., Rodeiro I, Garrido G., Delgado R., Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 619-26 2005.
51. Smith KR, Kim S, Recendez JJ, Teague SV, Menache MG, Grubbs DE, Sioutas C, Pinkerton KE. 2003. Airborne particles of the california central valley alter the lungs of healthy adult rats. *Environ Health Perspect.* 111: 902-8; discussion A408-9.
52. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic Biol Med.* 1995 Oct;19(4):499-504.

53. Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. 2003. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* 35:327-40
54. .Toxicología avanzada de Manuel Repetto Página 293 – 2009.
55. Valavanidis A., Fiotakis K., Bakeas E., Vlahogianni T. 2005. Electron paramagnetic resonance study of the generation of reactive oxygen species catalysed by transition metals and quinoid redox cycling by inhalable ambient particulate matter. *Redox Report* 10: 37-51.
56. Vega E., Reyes E., Ruiz H., García J., Sánchez G., Martínez-Villa G., González U. 2004. Analysis of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere of Mexico City during 2000-2002. *Air & Waste Management Association* 54: 786-798.
57. Wilson W.E., Chow J.C., Claiborn C., Fusheng W., Engelbrecht J., Watson J.G. 2002. Monitoring of particulate matter outdoors. *Chemosphere* 49: 1009-1043.

ANEXO. Reactivos y soluciones

A. Solución de buffer de fosfatos PBS:

Reactivo	Concentración stock	Marca comercial
K ₂ HPO ₄	0.3 M	JT Baker
KH ₂ PO ₄	0.3 M	JT Baker

Ajustar una alícuota del buffer dibásico de potasio (0.3 M) a pH 7.4 con el buffer monobásico de potasio (0.3 M). Mantener en refrigeración.

B. Solución de cloruro de sodio 3 M

C. Buffer de fosfatos salino (PBS):

Reactivo	Cantidad	Marca comercial
NaCl 3M	50 ml	JT Baker
Buffer de fosfatos	50 ml	JT Baker
Agua desionizada	Aforar a 1000 ml	

Disolver y mantener en refrigeración.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

A. Buffer de extracción

Reactivo	Cantidad	Marca comercial
NaCl	8 g	JT Baker
KCl	0.2 g	JT Baker
NaH ₂ PO ₄	1.44 g	JT Baker
KH ₂ PO ₄	0.24 g	JT Baker
Agua desionizada	Aforar a 1000 ml	

Disolver y ajustar a pH 7.4 con HCl. Aforar a 1000 ml y mantener en refrigeración.

B. Inhibidor de proteasas

Disolver una pastilla Complete Mini # de cat: 11836153001 Roche en 10 ml de Agua desionizada, disolver y almacenar a -20° C, protegido de la luz.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Reactivo de Bradford (BIO-RAD protein assay, Cat. # 500-0006) diluido 1:5

Albumina sérica bovina (SIGMA) 1mg/ml

Procedimiento:

Concentración (µg/ml)	BSA (µl)	Buffer de extracción	Bradford	Volumen final
0	0	160	40	200
2	2	158	40	200
4	4	156	40	200
6	6	154	40	200
8	8	152	40	200
10	10	150	40	200
Muestra	2	158	40	200

La muestra se diluye 1:40 y se toman 2 µl de la dilución para la determinación cuantitativa de proteína.

SDS-PAGE

A. Solución acrilamida/bis-acrilamida:

Reactivo	Cantidad	Concentración final	Marca comercial
Acrilamida	30.0 g	30%	BIO-RAD
N,N'-metilen-bisacrilamida	0.8 g	0.8%	BIO-RAD
Agua desionizada	Aforar a 100 ml		

Mezclar la acrilamida y N,N'-metilen-bisacrilamida y aforar a 100 ml de agua desionizada. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 μm (diámetro interno) y almacenar en refrigeración protegido de la luz.

B. Upper buffer (pH 6.8)

Reactivo	Cantidad	Concentración final	Marca comercial
Tris base	12.10 g	0.5 M	GIBCO
SDS	0.8 g	0.4%	BIO-RAD
Agua desionizada	Aforar a 200 ml		

Disolver el Tris y ajustar el pH a 6.8 con HCl, agregar el SDS, disolver y aforar a 200 ml. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 μm y almacenar en refrigeración.

C. Lower buffer (pH 8.7)

Reactivo	Cantidad	Concentración final	Marca comercial
Tris base	36.33 g	1.5 M	GIBCO
SDS	0.8 g	0.4%	BIO-RAD
Agua desionizada	Aforar a 200 ml		

Disolver el Tris y ajustar pH a 8.7 con HCl, agregar el SDS, disolver y aforar a 200 ml. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 μm y almacenar en refrigeración.

D. Solución de persulfato de amonio (BIO-RAD) al 10%. Almacenar en refrigeración y protegido de la luz.

E. TEMED N, N, N', N',- tetrametiletilendiamina (BIO-RAD)

F. Buffer de corrida (10X)

Reactivo	Cantidad	Marca comercial
Tris base	12.10 g	GIBCO
Glicina	72.05 g	USB
SDS	5 g	BIO-RAD
Agua desionizada	Aforar a 500 ml	

Disolver el Tris y la glicina, ajustar el pH a 8.3 con HCl, agregar el SDS, disolver y aforar a 1000 ml. Almacenar en refrigeración.

G. Loading buffer (2x)

Reactivo	Concentración final
Tris base	125 mM
EDTA	0.2 M
Glicerol	10%
SDS	10%
Azul de bromofenol	0.01 g
Agua desionizada	10 ml

Disolver y almacenar en congelación (-4°C)

H. Preparación del gel (unidades en mililitros)

Reactivo	Resolving gel al 12%	Stracking gel al 4.0%
Upper buffer	---	1.260
Lower buffer	2.5	---
Acrilamida/bis-acrilamida	4.060	0.660
Agua desionizada	3.440	3.080
TEMED	0.025	0.0125
Persulfato de amonio	0.050	0.0250
Total	10.075	5.375

Notas: El TEMED y persulfato de amonio son catalizadores para la polimerización de la acrilamida, por lo que deben agregarse al final e inmediatamente agregar la solución al molde.

Procedimiento:

Lavar los vidrios con jabón líquido y posteriormente enjuagarlos con agua desionizada, secarlos y montarlos con en la base. Marcar de bajo del peine 0.7 cm con un plumón, hasta donde llegará el resolving gel. Agregar cuidadosamente la solución de poli-acrilamida y dejar polimerizar 20 minutos, transcurrido este tiempo se agrega el stracking gel y el peine y se deja polimerizar 20 minutos.

WESTERN BLOT (electrotransferencia)

A. Buffer de tranferencia 10x

Reactivo	Cantidad	Marca comercial
Tris base	15.10 g	GIBCO
Glicina	72.05 g	USB
Agua desionizada	Aforar a 500 ml	

El pH óptimo de la solución es de 8.3 a 8.4. Almacenar en refrigeración. Este buffer requiere 20% de metanol, pero se recomienda agregarlo al diluir para usar inmediatamente.

B. Solución de lavado Tween 0.1%

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tween 20 al 10%	10 ml	BIO-RAD
PBS 1x	990 ml	

C. Solución bloqueadora

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Leche descremada en polvo	0.3 g	3%
PBS 1X	Aforar a 10 ml	

D. Membrana de nitrocelulosa BIO-RAD.

INMUNODETECCIÓN

A. Anticuerpos

Anticuerpos	Dilución	Marca comercial
Anti-HO-1	1:250	Santa Cruz
Anti-actina	1:500	Santa Cruz
Secundario IgG anti-rabbit	1:10000	Santa Cruz
Secundario IgG anti-mouse	1:12000	Santa Cruz

B. Kit de soluciones para quimioluminiscencia con peroxidasa RPN2209, ECL Wester blotting. Detection Reagents. Amersham Pharmacia Biotech.

C. Película radiográfica sensible al azul JAUMA JXA2.

D. Solución reveladora KODAK GBX (CAT 190 0943).

E. Solución fijadora KODAK GBX (CAT 190 1875).