



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ESTUDIOS DE
POSGRADO ESTUDIOS DE POSGRADO

**Efecto *in vitro* de las PM_{2.5} contaminantes del aire de la Zona
Metropolitana Valle de México, sobre la generación de especies
reactivas del oxígeno por leucocitos polimorfonucleares
humanos**

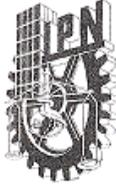
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN INVESTIGACIÓN EN
MÉDICA**

P R E S E N T A

M.C., MSc. Martha Patricia Sierra Vargas

Director de tesis: Dr. Juan José Hicks Gómez
Codirectora de tesis Dra. Ivonne Ma. Olivares Corichi



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 10:00 horas del día 25 del mes de febrero del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de titulada:

“EFECTO IN VITRO DE LAS PM_{2.5} CONTAMINANTES DEL AIRE DE LA ZONA METROPOLITANA VALLE DE MÉXICO, SOBRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO POR POLIMORFONUCLEARES HUMANOS”

Presentada por el alumno:

SIERRA
Apellido paterno

VARGAS
Apellido materno

MARTHA PATRICIA
Nombre(s)

Con registro:

A	0	4	0	5	5	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

DRA. IVONNE MARÍA OLIVARES CORICHI

Director de tesis

DR. JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ

DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ

DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

DR. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL

DR. JOSÉ ALFREDO SIERRA RAMÍREZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. ELEAZAR LARA PADILLA



SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F. el día **25** del mes **febrero** del año **2009**, la que suscribe **MARTHA PATRICIA SIERRA VARGAS** alumno (a) del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA** con número de registro **A-040556**, adscrita a **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **DR. JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Efecto *in vitro* de las PM_{2.5} contaminantes del aire de la Zona Metropolitana Valle de México, sobre la generación de especies reactivas del oxígeno por leucocitos polimorfonucleares humanos”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mpsierra@iner.gob.mx . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M.C., MSc. Martha Patricia Sierra Vargas

Nombre y firma

Esta tesis se realizó en:

Laboratorio de Bioquímica Inorgánica, Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental. Subdirección de Investigación Biomédica. Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. "Ismael Cosío Villegas". México, D.F.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACYT)

Proyecto SEMARNAT-2004-C01-27/A-1

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis por su apoyo, amistad y confianza absoluta:

Dr. Juan José Hicks Gómez

Jefe del Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

A mi codirectora por su amistad y apoyo incondicionales:

Dra. Ivonne Ma. Olivares Corichi

Investigadora Titular B

Escuela Superior de Medicina

Instituto Politécnico Nacional

Dra. Beatriz Cárdenas González y a su equipo

Dirección de Investigación Experimental en Contaminación Atmosférica

Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental

Instituto Nacional de Ecología

Dr. José David Sepúlveda Sánchez

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Por las facilidades y el apoyo que se me otorgó para la realización de esta Tesis a:

Dr. José Rogelio Pérez Padilla

Director General del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Por la orientación y consejos académicos

Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes

Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell

Por sus valiosos comentarios

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

Por el soporte en el diseño gráfico

Dr. Mario Humberto Vargas Becerra

A mis compañeras y compañero por su ayuda incondicional

M en I. Ma. Angélica Velázquez González

M en C. Yessica Dorin Torres Ramos

Técnica Superior, Martha Elena Munguía Castro

Secretaria, Yolanda Arce Herrera

Auxiliar de Laboratorio, Luis Alonso Ramírez Rufino

Al personal médico y paramédico del Instituto

EN ESPECIAL

A los pacientes que participaron, ya que sin ellos no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo

DEDICATORIA

Dedico el fruto de este trabajo a mis amados hijos:

Patrick Yakun

Pierre Yuray

Pablo Yurik

Al compañero ideal y amor de mi vida,

Pierre Antoine Février C.D. M.Sc.

*A quienes agradezco desde lo más profundo de mi ser, el tiempo
que les he robado para dedicarlo a la realización de este
proyecto*

Efecto *in vitro* de las PM_{2.5} contaminantes del aire de la Zona Metropolitana Valle de México, sobre la generación de especies reactivas del oxígeno por leucocitos polimorfonucleares humanos

Alumna: M.C., MSc. Martha Patricia Sierra Vargas

Director de tesis: Dr. Juan José Hicks Gómez

Codirectora de tesis: Dra. Ivonne Ma. Olivares Corichi

Miembros del Comité:

Dr. Rafael Campos Rodríguez
Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes
Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell
Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

ÍNDICE

GLOSARIO	11
RELACIÓN DE FIGURAS	13
RELACIÓN DE TABLAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. La contaminación del aire en la Ciudad de México	18
1.2. Clasificación de los contaminantes del aire	18
1.3. Principales contaminantes del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México	19
1.4 Interacción del material particulado con el aparato respiratorio	20
1.5. Aparato respiratorio. Generalidades	22
1.6. Mecanismos de depósito del material particulado en el aparato respiratorio	22
1.7 Distribución del material particulado en el aparato respiratorio	25
1.8 Mecanismos de depuración del material particulado del aparato respiratorio	27
1.9 Mecanismos de defensa del aparato respiratorio	29
1.10 Efectos del material particulado sobre la salud	30
1.11. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	31
1.12. Generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno por polimorfonucleares	34
1.13. Mecanismo de daño por especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo	34
1.14. Mecanismo fisiológico de protección antioxidante	36
1.15. Sistema antioxidante primario	37
1.16. Sistema antioxidante secundario	40
1.17. Sistema antioxidante terciario	42
1.18. Asma y su relación con el estrés oxidativo	42
1.19. Relación de los leucocitos polimorfonucleares y el asma	43
1.20. Biomarcadores de daño utilizados para la evaluación del estrés oxidativo	43
2. JUSTIFICACIÓN	45
3. HIPÓTESIS	46
4. OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo general	46
4.2 Objetivo específico	46
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	47
5.1. Tipo de estudio	47
5.2. Variable independiente	47
5.3. Variable dependiente	47
5.4. Tamaño de muestra	47
6. SELECCIÓN DE PACIENTES	48
6.1. Criterios de inclusión	48
6.2. Criterios de no inclusión	48

6.3. Criterios de eliminación	48
7. SELECCIÓN DEL GRUPO CONTROL	49
7.1. Criterios de inclusión	49
7.2. Criterios de no inclusión	49
7.3. Criterios de eliminación	49
8. MATERIAL Y MÉTODOS	50
8.1. Reactivos	50
8.2. Obtención del material particulado	50
8.3. Obtención y procesamiento de las muestras de sangre	51
8.4. Separación de los polimorfonucleares	51
8.5. Quimioluminiscencia	52
8.6. Determinación de los parámetros de estrés oxidativo en plasma	53
8.7. Análisis estadístico	54
8.8. Aspectos éticos	54
9. RESULTADOS	55
9.1. Características clínicas de la población de estudio	55
9.2. Características del material particulado	55
9.3. Generación in vitro de especies reactivas del oxígeno por los polimorfonucleares	59
9.4. Actividad plasmática de la mieloperoxidasa	61
9.5. Actividad plasmática de la paraoxonasa	62
9.6. Predisposición a la lipoperoxidación del plasma	63
10. DISCUSIÓN	65
11. CONCLUSIONES	69
12. BIBLIOGRAFÍA	70

GLOSARIO

NO ₂	Dióxido de nitrógeno
PA	Pacientes asmáticos
ABC	Área bajo la curva
BC	Carbón negro
CENICA	Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental
QL	Quimioluminiscencia
Cu	Cobre
DMSO	Dimetil sulfóxido
Fe	Hierro
FeCl ₂	Cloruro ferroso
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad Vital Forzada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HO [•]	Radical hydroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
GC	Grupo control
IL-6	Interleucina-6
KRPG	Amortiguador de fosfato de Krebs-Ringer adicionado con glucosa
LDL	Lipoproteínas
MCMA	Área Metropolitana de la Ciudad de México
MPO	Mieloperoxidasa
N	Neutrófilos
NADPH	Fosfato de dinucleotido de adenine y nicotinamida reducido
NGA	Neutrófilos del grupo de asma
NGC	Neutrófilos del grupo control
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
PM ₁₀	Material particulado con diámetro < 10µm
PM _{2.5}	Material particulado con diámetro < 2.5 µm

PON	Paraoxonasa
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
S	Azufre
SO ₂	Dióxido de azufre
SOD	Superoxide dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNF α	Factor de necrosis tumoral-alfa
USA EPA	agencia de Protección al Medio Ambiente de los Estados Unidos
Zn	Zinc

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos de depósito de las partículas en el árbol respiratorio	23
Figura 2.	Distribución de las partículas en el sistema respiratorio	26
Figura 3.	Depuración alveolar de las partículas	28
Figura 4.	Material particulado colectado en CENICA	57
Figura 5.	Composición metálica de las PM ₁₀ colectadas en CENICA	57
Figura 6.	Microfotografía de partículas respirables colectadas en CENICA	58
Figure 7.	Generación in vitro de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por polimorfonucleares en contacto con PM _{2.5}	60
Figura 8.	Relación área bajo la curva/actividad de mieloperoxidasa de asma comparado con el grupo control. (ABC/MPO) para el grupo	62
Figura 9.	Relación del área bajo la curva/actividad de paraoxonasa (ABC/PON) para el grupo de asma comparado con el grupo control	63
Figura 10.	Susceptibilidad del plasma a la lipoperoxidación.	64

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1.	Distribución del parque vehicular en la ZMVM	17
Tabla 2.	Marcadores de utilidad para la evaluación del estrés oxidativo	44
Tabla 3.	Características clínicas de la población de estudio	55
Tabla 4.	Clasificación individual de PM ₁₀ por microscopía electrónica de barrido	58
Table 5.	Características bioquímicas de la población de estudio	61

RESUMEN

La ciudad de México, es un área con una elevada densidad de población y con características geográficas especiales que contribuyen al estancamiento de los contaminantes del aire que se generan en esa zona. La contaminación por partículas ha tomado gran relevancia e interés por parte de varios grupos de investigación a nivel mundial. Actualmente se considera que la exposición a partículas aún a las concentraciones encontradas en aire ambiente aumenta el riesgo de desarrollar y/o agravar en poblaciones susceptibles, la evolución con la presencia de episodios agudos como es el caso de los paciente con enfermedades cardiorrespiratorias, quienes adicionalmente presentan un estado de estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las partículas finas sobre el estallido respiratorio de neutrófilos obtenidos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de asma residentes en la zona metropolitana del valle de México. Se estudiaron 6 pacientes con diagnóstico de asma moderada y once sujetos clínicamente sanos. Los neutrófilos se aislaron por punción venosa y se incubaron in vitro con partículas finas (PM2.5) para favorecer la generación de especies reactivas del oxígeno la cual fue registrada mediante quimioluminiscencia. También se evaluó la susceptibilidad a la lipoperoxidación, la actividad plasmática de las enzimas mieloperoxidasa y paraoxonasa mediante espectrofotometría. Los pacientes con asma presentaron una menor actividad de paraoxonasa, una mayor susceptibilidad a la lipoperoxidación así como un incremento en la actividad de la mieloperoxidasa. La incubación de los neutrófilos de estos pacientes con las partículas finas incrementó la generación de las especies reactivas del oxígeno comparada con el grupo control.

Los resultados de este estudio sugieren que los pacientes con asma presentan una mayor lipoperoxidación debido a una disminución en la capacidad antioxidante. Además, las partículas finas facilitaron el incremento del estallido respiratorio en los neutrófilos de estos pacientes, lo que podría favorecer una mayor susceptibilidad a la infección y en consecuencia una alteración en el control de las crisis de asma.

ABSTRACT

The Mexico City Metropolitan Area is densely populated, and toxic air pollutants are generated and concentrated at a higher rate because of its geographic characteristics. It is well known that exposure to particulate matter, especially to fine and ultra-fine particles, enhances the risk of cardio-respiratory diseases, especially in populations susceptible to oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effect of fine particles on the respiratory burst of circulating neutrophils from asthmatic patients living in Mexico City.

In total, 6 subjects diagnosed with mild asthma and 11 healthy volunteers were asked to participate. Neutrophils were isolated from peripheral venous blood and incubated with fine particles, and the generation of reactive oxygen species was recorded by chemiluminescence. We also measured plasma lipoperoxidation susceptibility and plasma myeloperoxidase and paraoxonase activities by spectrophotometry.

Asthmatic patients showed significantly lower plasma paraoxonase activity, higher susceptibility to plasma lipoperoxidation and an increase in myeloperoxidase activity that differed significantly from the control group. In the presence of fine particles, neutrophils from asthmatic patients showed an increased tendency to generate reactive oxygen species after stimulation with fine particles (PM_{2.5}).

These findings suggest that asthmatic patients have higher oxidation of plasmatic lipids due to reduced antioxidant defense. Furthermore, fine particles tended to increase the respiratory burst of blood human neutrophils from the asthmatic group. On the whole, increased myeloperoxidase activity and susceptibility to lipoperoxidation with a concomitant decrease in paraoxonase activity in asthmatic patients could favor lung infection and hence disrupt the control of asthmatic crises.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *La contaminación del aire en la Ciudad de México*

La Cuenca del Valle de México está situada a una altura de 2240 metros sobre el nivel del mar, se encuentra rodeada por una cadena montañosa integrada por las formaciones de la Sierra de Monte Bajo, Sierra de las Cruces, Sierra del Chichinautzin, Sierra Nevada, Sierra del Río Frío.

Debido a su altitud, el contenido de oxígeno en esta zona es aproximadamente 23% menor que a nivel del mar, lo que origina que los procesos de combustión sean menos eficientes y emitan una mayor cantidad de contaminantes⁽¹⁾.

Entre los principales factores fisiográficos y climáticos que afectan la calidad del aire se encuentran los siguientes:

- El entorno montañoso constituye una barrera natural que dificulta la circulación del viento y una adecuada dispersión de los contaminantes.
- La altitud propicia frecuentemente inversiones térmicas favoreciendo la acumulación de contaminantes.
- La posición continental entre dos océanos, provoca sistemas anticiclónicos frecuentes, los cuales tienen la capacidad de generar grandes masas de aire inmóvil.
- La latitud tropical favorece una intensa radiación solar favoreciendo la formación de contaminantes fotoquímicos como el ozono.

Aunado a lo anterior, las características climáticas de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) son uno de los principales factores que condicionan la acumulación o ineficiente dispersión de los contaminantes.

Se reconoce una estación húmeda (lluvias) y una estación de secas que se caracteriza por presentar contenido de humedad baja con variaciones de temperatura de hasta 15°C, este hecho permite dividirla en dos: Seca-Caliente y Seca-fría. La primera comprende de marzo a mayo y la segunda de noviembre a febrero⁽²⁾.

La entrada principal del viento troposférico al Valle de México se ubica en la zona norte donde el terreno es llano a excepción de la pequeña Sierra de Guadalupe.

Las masas de viento de los sistemas meteorológicos interactúan con la orografía del Valle para producir flujos, confluencias, convergencias y remolinos que provocan el arrastre, la remoción o la acumulación de los contaminantes del aire.

La ventilación de la ZMVM es muy rápida dando como resultado que a escala regional y para el 50% de las partículas, el tiempo de residencia sea menor a 7 horas y el transporte de 2 a 2.5 días⁽³⁾.

Otro factor que contribuye de manera importante a la contaminación del aire es el transporte, de éste, los autos particulares representan el 93% de las unidades destinadas al transporte de personas y sólo captan cerca del 20% de los viajes-persona-día que se realizan en la ZMVM. En contraste, las combis y microbuses representan menos del 2% y en ellos se realizan cerca del 60% de los viajes-persona-día. En la Tabla 1, se muestra la distribución del parque vehicular destinado al transporte de personas. Se estima que uno de los sectores vehiculares de mayor contribución a las emisiones al aire es el auto transporte de carga, flota compuesta de tractocamiones, vehículos mayores y menores a 3 toneladas que en suma dan más de 330 mil unidades en circulación y su contribución a las emisiones de contaminantes en conjunto suman más de 451 mil ton/año⁽⁴⁾.

Tabla 1.- Distribución del parque vehicular en la ZMVM

Tipo de vehículo	Número de vehículos	%
Autos particulares	2967.893	93.2
Taxis	118.634	4.0
Combis	19.485	0.7
Microbuses	33.051	1.1
Autobuses	32.565	1.1
Total	3171.628	100

1.2 Clasificación de los contaminantes del aire

Los contaminantes del aire pueden dividirse en dos grandes grupos⁽⁵⁾:

- Contaminantes primarios

Son los que provienen directamente de las fuentes de emisión, por ejemplo: plomo (Pb), monóxido de carbono (CO), óxidos de azufre (SO_x), óxidos de nitrógeno (NO_x), hidrocarburos (HC), material particulado, entre otros.

- Contaminantes secundarios

Son los que se originan por la interacción entre dos o más contaminantes primarios, o por la reacción de éstos con los componentes naturales de la atmósfera. Entre estos tenemos: ozono (O₃), peroxiacetil-nitrato (PAN), hidrocarburos (HC), sulfatos (SO₄), nitratos (NO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), material particulado (PM), entre otros.

Dependiendo de la fuente que los genera, los contaminantes pueden dividirse en⁽⁵⁾:

- Fuentes puntuales estacionarias o fijas

Se refiere a un punto fijo o estacionario, ejemplos de estas son: las plantas de energía, industrias químicas, refinerías de petróleo, fábricas, etc.

- Fuentes móviles

Aquí se incluyen a las diversas formas de transporte. Se considera que la principal fuente móvil de contaminación del aire es el automóvil, ya que produce grandes cantidades de monóxido de carbono (CO) y cantidades menores de óxidos de nitrógeno (NO_x) y compuestos orgánicos volátiles (COVs).

- Fuentes de área

Se refiere a todas aquellas que no pueden ser incluidas de manera eficiente en un inventario de fuentes puntuales, pero que en conjunto pueden afectar la calidad del aire en una región, por ejemplo: el uso de madera para cocinar o calentar la casa, las imprentas, las estaciones de servicio, y las tintorerías.

- Fuentes naturales

Por otro lado, existen dos fuentes naturales significativas, que son comúnmente consideradas en los inventarios de emisiones atmosféricas:

a) Emisiones Biogénicas

Son aquellas que provienen de la vegetación (ejemplo: pastos, cultivos, arbustos, bosques, etc.) y cuyo principal componente son los hidrocarburos, y éstos son vertidos a la atmósfera en cantidades considerables.

b) Emisiones de Suelos

Los procesos de desnitrificación (es decir, la reducción de nitritos y nitratos a nitrógeno gaseoso como N_2 o NO_x) y la utilización de fertilizantes nitrogenados producen el óxido nitroso (N_2O). Se estima que las emisiones de NO_x provenientes de los suelos constituyen un 16% de la cantidad global de NO_x en la tropósfera.

1.3 Principales contaminantes del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México

Los contaminantes del aire que constituyen los contaminantes criterio, son aquellos identificados como nocivos para la salud y el bienestar de los seres humanos; por lo que se han establecido límites de exposición permisibles a los que la población pudiera estar expuesta sin tener daños a la salud. Para cada uno de ellos se han desarrollado normas que establecen las concentraciones máximas de los contaminantes atmosféricos que se permiten durante un período definido, estos valores límite tienen la finalidad de proteger la salud humana y el medio ambiente⁽⁶⁾.

Los contaminantes criterio son los siguientes:

- Bióxido de azufre (SO₂)
- Bióxido de nitrógeno (NO₂)
- Material Particulado (PM)
- Plomo (Pb)
- Monóxido de carbono (CO)
- Ozono (O₃)

Las normas mexicanas que abarcan de la NOM-020-SSA1-1993 a la NOM-026-SSA1-1993, establecen los criterios para evaluar la calidad del aire con respecto a los contaminantes criterio.

En este trabajo nos enfocaremos a los daños a la salud producidos por la exposición a material particulado y en especial a partículas finas (PM_{2.5}).

1.4 Interacción del material particulado con el sistema respiratorio

El material particulado (PM), constituye un ejemplo de un aerosol, el cual es una suspensión relativamente estable en un gas (comúnmente aire) de partículas pequeñas caracterizadas por una relación masa-superficie elevada y que contienen compuestos tóxicos con propiedades fisicoquímicas variadas⁽⁷⁾. Se originan mediante dos fuentes, la fuente natural, formada por los procesos de polinización de las plantas e incendios forestales, la fuente antropogénica que abarca, desde la quema de combustibles hasta la fertilización de campos agrícolas.

El tamaño del material particulado se determina con base al diámetro aerodinámico, que se refiere al diámetro equivalente al de una partícula esférica de densidad unitaria (1g/cm³), la cual tiene la misma velocidad de depósito que la partícula considerada⁽⁷⁾. El diámetro de las PM varía desde 0.005 hasta 100 micras (10⁻⁶) y se clasifican en: PM₁₀, PM_{2.5} y ultrafinas o nanopartículas PM_{<0.1}.

Las PM_{10} se generan por la combustión de materiales orgánicos y por los procesos industriales, durante los cuales se lleva a cabo la condensación de gases, humos y vapores; además de las actividades de molienda y aplastamiento. A esta porción de PM se le denomina fracción gruesa y por su tamaño que es relativamente grande, tienen una velocidad de sedimentación alta y son removidas del aire en horas⁽⁵⁾. Su composición química se caracteriza por la presencia de elementos de la corteza terrestre (sílice, aluminio).

El siguiente grupo de partículas está formado por aquellas menores a $2.5 \mu m$, también llamado fracción fina ($PM_{2.5}$). Son generadas por nucleación (aglomeración) homogénea y heterogénea, y por la degradación de las PM_{10} . Su vida media en la atmósfera es de días y pueden viajar grandes distancias. La capacidad de llegar a la vía aérea inferior determina su mayor grado de toxicidad⁽⁷⁾.

Existe un último grupo de partículas, las ultrafinas (UFP), también llamadas nanopartículas, las cuales tienen un diámetro menor a $0.1 \mu m$ (100 nm). Debido a su tamaño, éstas se distinguen por tener una mayor posibilidad de depositarse en los alvéolos, estableciendo una mayor superficie de contacto. Las UFP tiene una forma especial, ya que constituyen conglomerados, debido a su tamaño son transportadas a través de grandes distancias y tienen la característica de adsorber otros contaminantes tóxicos incluyendo gases⁽⁸⁾. Estas partículas tienen una mayor posibilidad de establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolocapilar originando efectos nivel sistémico⁽⁹⁾. Dado su contenido rico en compuestos químicos oxido-reductores, estas partículas producen una gran respuesta inflamatoria en tejidos pulmonares y extrapulmonares, por ejemplo, el endotelio vascular incluyendo el de los vasos coronarios⁽⁹⁾.

Varios estudios, llevados a cabo en México, Estados Unidos y en Europa, han encontrado que la exposición prolongada a partículas provenientes de la combustión es un factor importante de riesgo ambiental en casos de mortalidad por cáncer pulmonar y enfermedades cardio-pulmonares⁽¹⁰⁾.

1.5 Sistema respiratorio, generalidades

La principal fuente de oxígeno para el cuerpo lo constituye el aire inspirado, pero durante esta maniobra, se introducen simultáneamente numerosas partículas, gases tóxicos y microorganismos hacia el tracto respiratorio. Para una mejor comprensión sobre la interacción de las partículas dividiremos el aparato respiratorio en tres regiones: vía respiratoria superior, llamada también extratorácica, abarca la nariz, la nasofaringe, la boca, la orofaringe, laringofaringe; la vía respiratoria media o torácica, que incluye la parte inferior de la laringe, la tráquea, los bronquios hasta los bronquiolos terminales y la vía respiratoria inferior o alveolar, la cual incluye a los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alvéolos⁽¹¹⁾.

1.6 Mecanismos de depósito del material particulado en el sistema respiratorio

Existen 5 mecanismos por los cuales una partícula se puede depositar en el tracto respiratorio, estos mecanismos se describen a continuación⁽⁷⁾:

- **Impactación**

Se produce cuando la trayectoria del flujo de aire cambia de manera abrupta debido al cambio en la dirección de las vías aéreas. Es el principal mecanismo de depósito de las partículas mayores a 5 μm .

- **Intercepción**

Se origina cuando un extremo o una parte de la superficie de la partícula se pone en contacto con las paredes de las vías respiratorias hasta que se detiene debido a la fuerza de fricción. Las fibras se depositan principalmente por este mecanismo.

- **Sedimentación**

Es un mecanismo que depende de la gravedad, y se produce cuando la partícula es balanceada debido a la flotabilidad del aire y a su resistencia. De este modo se depositan las partículas con diámetro de entre 1-5 μm .

- Difusión

Se produce debido al bombardeo de la partícula por las moléculas de gas, provocando un movimiento de tipo Browniano, el cual en un momento determinado hace que la partícula entre en contacto con la pared de las vías aéreas. Mediante este mecanismo se depositan partículas menores a $0.5 \mu\text{m}$.

- Atracción electrostática

De manera natural las partículas contienen una carga eléctrica determinada; esto provocará una atracción sobre la superficie de las vías aéreas (Figura 1).

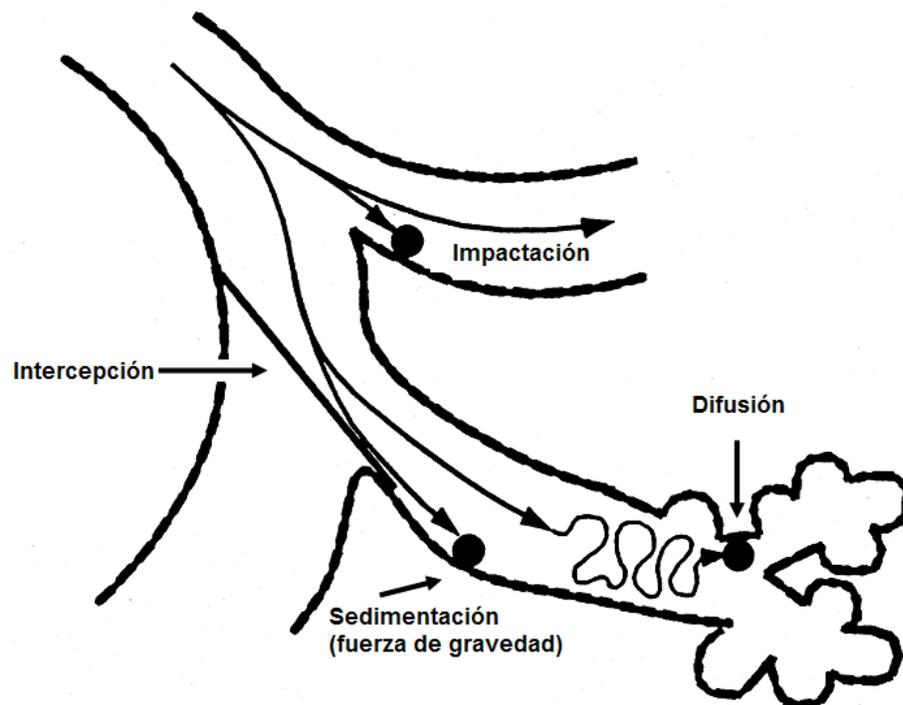


Figura 1.- Mecanismos de depósito de las partículas en el árbol respiratorio

Es importante señalar que los mecanismos de depósito no se ejercen de manera específica a nivel del tracto respiratorio, sino que actúan en combinación y el predominio de unos sobre otros dependerá de los siguientes factores⁽¹²⁾:

Características de la partícula

- Tamaño
- Forma
- Densidad
- Higroscopicidad
- Carga eléctrica

Geometría del aparato respiratorio

- Calibre de las vías aéreas
- Patrón de ramificación del árbol traqueobronquial
- Longitud de las vías aéreas terminales

Características de la ventilación

- Tipo de respiración
- Frecuencia respiratoria
- Volumen corriente
- Flujo y velocidad
- Distribución interlobular de la respiración
- Duración de las pausas respiratorias

Otros factores

- Exposición a irritantes
- Enfermedades pulmonares
- Crecimiento
- Edad
- Género

1.7 Distribución del material particulado en el aparato respiratorio

Dependiendo del nivel en que éstas se depositen podemos clasificarla en cuatro fracciones^(11,12) (Figura 2):

Fracción inhalable

Se refiere a la totalidad de las partículas que penetran en el sistema respiratorio ya sea por la nariz o por la boca.

Fracción extratorácica

Es la cantidad de partículas que penetran a nivel de las vías respiratorias superiores hasta la parte superior de la laringe. En esta región se depositan las partículas con un diámetro de 5 – 10 μm (PM_{10}).

Fracción torácica

Las partículas con diámetro de 2.5 - 5 μm se depositan entre la laringe y los bronquiolos terminales.

Fracción respirable o alveolar

Se refiere a la región comprendida desde los bronquiolos respiratorios hasta los alvéolos. Las partículas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) son susceptibles de depositarse a este nivel y en especial las ultrafinas o nanopartículas, las cuales tienen un diámetro aerodinámico menor a 0.1 μm ó 100 nm.

En la figura 2, se esquematiza la distribución de las partículas en el aparato respiratorio dependiendo de su diámetro aerodinámico.

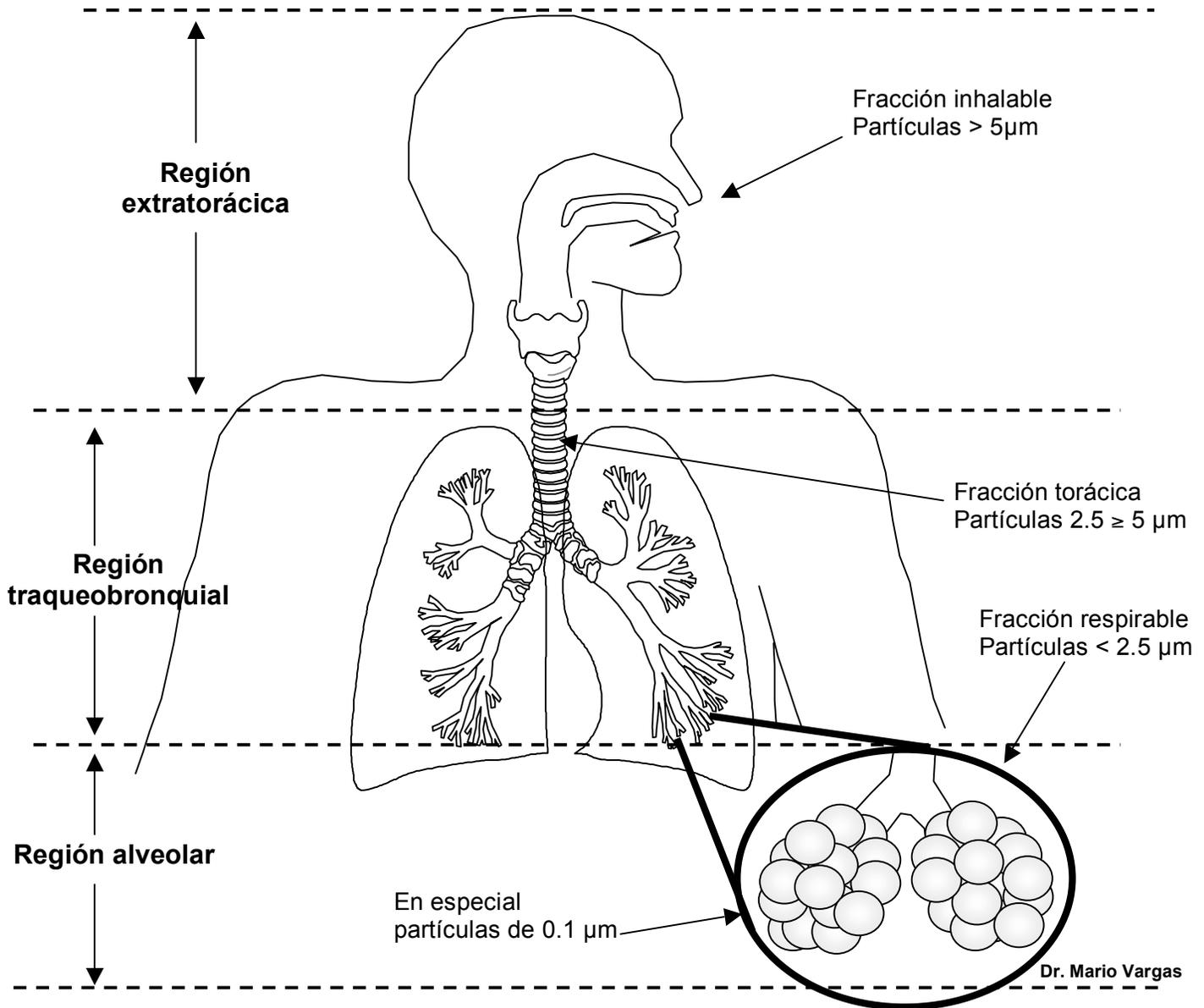


Figura 2.- Distribución de las partículas en el sistema respiratorio

1.8 Mecanismos de depuración del material particulado del aparato respiratorio

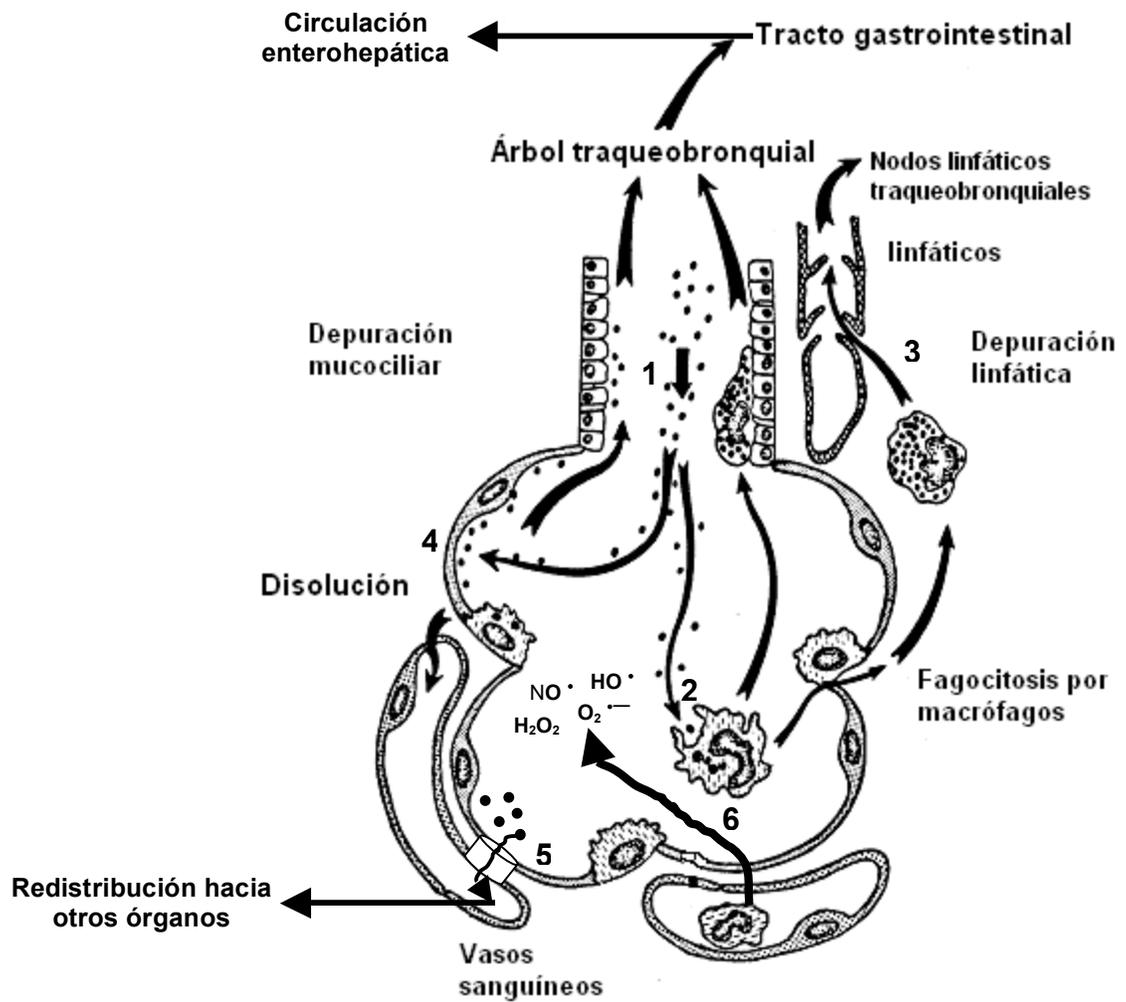
Una vez analizados los factores que influyen en la distancia de penetración de las partículas contaminantes en el árbol traqueobronquial, se considerarán los mecanismos con que cuenta el aparato respiratorio para eliminarlas⁽⁷⁾.

Depuración traqueobronquial

Está determinada por el escalador mucociliar, que transporta las partículas envueltas en una capa de moco y/o aquellas que han sido fagocitadas por los macrófagos. Este mecanismo es relativamente rápido y se completa dentro de un lapso de 24 a 48 hrs.

Depuración pulmonar

Este mecanismo incluye cuatro alternativas: **1)** las partículas pueden quedar atrapadas en la capa de moco y ser eliminadas vía el escalador mucociliar; **2)** las partículas pueden ser fagocitadas por los macrófagos y ser eliminadas vía la circulación linfática; **3)** el material depositado puede pasar por un proceso de disolución y ser transferido a la circulación y **4)** debido a su tamaño, las partículas pueden atravesar la barrera alveolar e ingresar directamente al torrente circulatorio para de esta forma ser distribuidas a otros órganos del cuerpo. El tiempo de residencia de las partículas en el tracto respiratorio va a depender de su grado de solubilidad y de la sobrecarga (body burden) pudiendo ser desde horas hasta meses (Fig. 3).



1. Depósito de las partículas a nivel alveolar
2. Fagocitosis por macrófagos alveolares
3. Migración del macrófago hacia los nodos linfáticos y circulación linfática
4. Disolución de partículas y transferencia hacia el torrente sanguíneo
5. Las nanopartículas atraviesan la barrera alveolar hacia la circulación sanguínea
6. Quimiotaxis de neutrófilos con producción de ERO

Figura 3.- Depuración alveolar de las partículas

1.9 Mecanismos de defensa del sistema respiratorio

Los mecanismos de defensa pulmonar pueden ser constitutivos o mecánicos que incluyen respuestas automáticas o inmediatas, y los adaptativos o inmunológicos que requieren un lapso de latencia, desarrollan memoria y provocan efectos más intensos cuando se ha tenido un contacto previo. A continuación se describe brevemente cada uno de estos mecanismos⁽¹³⁾.

Mecanismos constitutivos

Representan una barrera importante para prevenir la penetración ya sea de partículas o de microorganismos $>3\mu\text{m}$ hacia las vías respiratorias inferiores. Entre éstos se encuentran:

- La nariz
- Mucosidad de las vías respiratorias
- Estornudo
- Tos
- Escalador mucociliar
- Epitelio respiratorio

Mecanismos adaptativos o inmunológicos

Entran en acción cuando los mecanismos constitutivos son ineficientes para controlar la agresión sufrida por el aparato respiratorio.

Un elemento defensivo muy importante está formado por estructuras linfoides del anillo de Waldeyer. Entre los mecanismos inmunológicos implicados en la defensa pulmonar tenemos los siguientes:

- Inmunoglobulina A secretora (S-IgA)
- Inmunoglobulina M (IgM)
- Inmunoglobulina G (IgG)
- Inmunoglobulina E (IgE)
- Complemento
- Células epiteliales

- Eosinófilos
- Mastocitos
- Basófilos
- Neumocitos tipo I y II
- Macrofagos alveolares
- Linfocitos
- Neutrofilos
- Surfactante

1.10 Efectos del material particulado sobre la salud

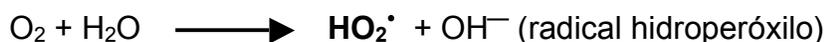
Los efectos a la salud ocasionados por una exposición al material particulado pueden ser locales o sistémicos. La alteración mínima ocasionada por los contaminantes es una irritación en las mucosas y una reacción inflamatoria transitoria, debidas a un efecto oxidante. Una concentración mayor o tiempo de exposición prolongado a los contaminantes, producen reacciones más graves y pueden originarse respuestas tales como el espasmo de los bronquios, el imbalance elastolítico y la carcinogénesis provocada por algunas sustancias^(14,15). Estudios efectuados en la ciudad de México han demostrado efectos diversos, que van desde alteraciones leves y transitorias, manifestadas por irritación de los ojos, nariz y vías respiratorias⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ hasta hiperinflación pulmonar en niños y alteraciones morfológicas pulmonares en animales^(19,20). Algunos de los grupos susceptibles, como los niños o los asmáticos pueden tener mayores repercusiones que los hagan acudir en mayor número a consulta o al servicio de urgencias⁽¹⁴⁾. Uno de los hallazgos más impactantes y que se ha reproducido en diversas ciudades es que un incremento en los niveles de partículas, aun dentro de la norma se relaciona con un incremento en la mortalidad principalmente en los grupos susceptibles: niños, ancianos y enfermos con alteraciones cardiopulmonares. Romieu *et al.*⁽²¹⁾ realizaron un estudio en la ciudad de México, en donde evaluaron la exacerbación de crisis de asma en niños menores de 13

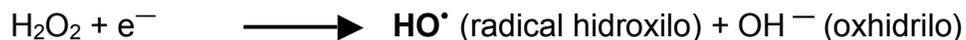
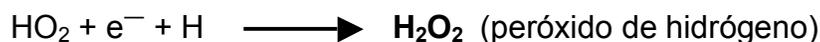
años y concluyeron que un incremento de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} se relaciona con un aumento del 8% en los casos de enfermedad de vías respiratorias inferiores y que un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el promedio semanal de $\text{PM}_{2.5}$ se asocia a un incremento del 21% en los casos de enfermedad de vías respiratorias inferiores. Otro estudio recientemente efectuado también en la Ciudad de México en niños asmáticos de 6 a 14 años de edad, encontró que los que habitaban en zonas de mayor densidad de tráfico tenían una incidencia mayor de síntomas y de uso de broncodilatador, un incremento en la concentración de $\text{PM}_{2.5}$ de $17.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ se asoció con un incremento del 11.1% en tos y del 8.8% en las sibilancias⁽¹⁸⁾. Los estudios de Miller *et al.*, mostraron que por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, el riesgo de eventos cardiovasculares aumentó el 24% y 76% de aumento en el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular en mujeres postmenopáusicas⁽²²⁾. Estudios recientes sugieren que el promedio de la esperanza de vida perdida relacionada a una exposición crónica a la contaminación ambiental es entre 1.8 y 3.1 años para individuos que habitan en las zonas más contaminadas de las ciudades Americanas⁽²³⁾. Aunque varios son los estudios que se han realizado, el mecanismo de daño originado por la exposición al material particulado no está bien dilucidado, pero se considera que las especies reactivas del oxígeno (ERO) y los radicales libres (RL) tienen un papel preponderante^(24,25).

1.11 Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno

Los RL son moléculas que tienen un electrón no pareado en su último orbital, lo que les confiere la característica de ser muy inestables y reactivos^(26,27).

El proceso de reducción del O_2 da origen a dos moléculas de agua (H_2O), pero durante la secuencia de reducciones se originan varios RL:





En condiciones normales, los RL cumplen funciones fisiológicas importantes y tienen origen endógeno y exógeno⁽²⁶⁾.

1. Generación endógena

La generación endógena incluye su producción por las células inflamatorias principalmente, así como durante el proceso de isquemia-reperfusión. Las fuentes endógenas de RL incluyen las siguientes:

Durante el metabolismo aerobio normal

Las mitocondrias reducen el O_2 molecular de forma secuencial hasta generar agua, durante este proceso, alrededor del 2 al 5% del O_2 utilizado escapa de este ciclo y va a formar el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) el cual será dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la superóxido dismutasa (SOD) y éste en presencia de hierro (Fe^{2+}) o cobre (Cu^{++}) generará el radical hidroxilo (HO^\bullet) a través de dos mecanismos:

a) Reacción de Fenton:



b) Reacción de Haber-Weiss:



Generación de H_2O_2 por los peroxisomas

A través de la Acil-coA oxidasa, dopamina, β -hidroxilasa, urato oxidasa.

Durante el metabolismo de los xenobióticos

Mediante la activación del sistema enzimático citocromo P-450.

Durante el estallido respiratorio producido por las células fagocíticas.

La activación de este sistema puede estar dado por: bacterias, complejos inmunes, citocinas como TNF- α , fragmentos del complemento, éster de forbol, diacilglicerol, leucotrienos, ionóforo de calcio, material particulado y la misma presión parcial de O₂.

2. Generación exógena

Las fuentes exógenas de radicales libres se llevan a cabo durante la exposición a:

Contaminación ambiental

Contaminantes como el ozono (O₃), dióxido de nitrógeno (NO₂), y las PM.

Radiación ionizante (neutrones, rayos X, o rayos γ)

Éstos llevan a la formación de HO[•] como resultado de la fusión homolítica de los puentes de oxígeno-hidrógeno en el agua; la radiación ultravioleta (UV) también ha generado la formación de ERO.

Humo de cigarro

El humo de cigarro produce la formación de H₂O₂, como resultado de la autooxidación de los polifenoles como el catecol y la hidroxiquinona que se encuentran en el humo del cigarro así como la formación de estas especies por la activación de los fagocitos derivada de esta exposición.

Pesticidas

El paraquat, la bleomicina, algunos aditivos alimentarios como el tolueno butilado y el hidroxianizol butilado, tienen la capacidad de formar RL.

Hiperoxia terapéutica

Conlleva al aumento en la formación intracelular de O₂^{•-} y de H₂O₂.

Fenómenos de isquemia-reperfusión

Por ejemplo: infarto agudo de miocardio, tromboembolia pulmonar.

1.12 Generación de Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno por leucocitos polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son considerados como las células efectoras de mayor importancia en los procesos inflamatorios. Se considera que hay 1 neutrófilo por cada cien alvéolos, pero la vasculatura pulmonar y más específicamente el lecho capilar sirven como reservorio. Se considera que representan hasta el 2% de las células presentes en el LBA de sujetos clínicamente sanos⁽²⁸⁾. El papel principal de estas células, es defender al organismo de los microorganismos invasores, por lo que se considera que la capacidad fagocítica es superior a la del macrófago alveolar. En respuesta al daño y como mecanismo de defensa, estas células producen especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^{\bullet} , HO^{\bullet} ,) y liberan enzimas como elastasa, mieloperoxidasa, hidrolasa, lactoferrina, cathepsina G, y defensinas, durante el proceso de activación denominado *estallido respiratorio*. La liberación de ERO, ERN, proteasas neutrales y enzimas lisosomales puede degradar la matriz pulmonar y provocar daño citotóxico sobre las células endoteliales y epiteliales, sobre todo las de tipo I y los fibroblastos⁽²⁹⁾.

1.13 Mecanismo de daño por especies reactivas del oxígeno y Estrés Oxidativo.

El mecanismo de daño producido por los RL y las ERO ha sido ampliamente estudiado. El daño es originado principalmente por la facilidad que tienen estas especies de reaccionar y modificar la estructura y función de un amplio espectro de biomoléculas. Los principales mecanismos de daño incluyen: ⁽³⁰⁾

1. Lipoperoxidación

Se refiere al daño oxidativo producido sobre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ya que éstos contienen dos o más dobles enlaces carbono-carbono. Se caracteriza por una fase de *iniciación*, una fase de *propagación* y una de *terminación*. Los productos finales producidos por este tipo de daño son cetonas, hidrocarburos (pentano, etano), isoprostanos (compuestos formados durante la

peroxidación del ácido araquidónico y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-trans-nonenal), los cuales son capaces de alterar la función membranal.

2. Oxidación de carbohidratos

En su forma lineal la glucosa es un aldehído capaz de reaccionar con los grupos amino de las proteínas, de los fosfolípidos e inclusive del DNA, en condiciones fisiológicas esta reacción se da en forma lenta y es reversible denominándose glicación este proceso no es enzimático y no requiere la presencia de ROS y de RNS. Sin embargo, cuando el daño es producido por la presencia de estas especies, los productos de glicación se pueden oxidar dando lugar a los productos de glicación avanzada (AGEs) proceso denominado glicoxidación. Este tipo de daño se produce de manera irreversible modificando permanentemente proteínas, fosfolípidos o DNA.

3. Oxidación de proteínas

Todas las proteínas son susceptibles a ser dañadas por las ERO y las ERN, ya sea de forma directa o bien por productos secundarios como aldehídos derivados del daño a otras biomoléculas. Las principales alteraciones que sufren las proteínas ante la oxidación son: pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis⁽³¹⁾. La carbonilación es una reacción irreversible y ocurre principalmente en los residuos de prolina, arginina y lisina debido a que éstos son más susceptibles al daño por metales. Actualmente se ha relacionado el aumento en la carbonilación con ciertas patologías como son las enfermedades inflamatorias⁽³²⁾ y diabetes mellitus⁽³³⁾.

4. Daño al ácido desoxirribonucleico (ADN)

Se produce por oxidación y se pueden dañar las cuatro bases y la deoxiribosa, a la cual se le sustrae un hidrógeno dando lugar a la muerte celular o al desarrollo de cáncer. Aunque se pueden dañar las bases y la deoxiribosa, el sello distintivo de daño al ADN por ERO y ERN son las deleciones, aunque también favorecen la apoptosis mediante mecanismos que involucran a la mitocondria⁽³⁴⁾.

El hecho de generar una mayor cantidad de estas especies a tal grado que éstas sobrepasen los mecanismos antioxidantes, da origen a una pérdida en la homeostasis del ciclo prooxidante-antioxidante que conlleva a un riesgo mayor de daño a biomoléculas de organismos vivos, estado denominado estrés oxidativo⁽³⁵⁾, el daño oxidativo a biomoléculas puede estar dado no solo por un aumento en la generación de especies reactivas, sino también por una deficiencia en la reparación de este daño o la ineficacia de remplazar a las biomoléculas así dañadas, o bien por una disminución de la capacidad antioxidante ya sea por un deficiente aporte nutrimental o por una mutación dando como resultado una expresión deficiente de las enzimas antioxidantes⁽³⁶⁾.

1.14 Mecanismo fisiológico de protección antioxidante

El cuerpo humano esta provisto de mecanismos para prevenir la propagación de los radicales libres generados durante los diversos procesos bioquímicos producidos durante el metabolismo celular. De esta forma la generación de ERO y de ERN tiene un control balanceado, es decir, su generación tiene una tasa similar de degradación mediado por los mecanismos antioxidantes. Podemos definir un antioxidante como cualquier sustancia que impide o previene de manera significativa la oxidación de una molécula blanco⁽³⁷⁾ y un antioxidante dietario se refiere a una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas del oxígeno, del nitrógeno o ambas en condiciones fisiológicas en humanos⁽³⁸⁾. A nivel pulmonar también encontramos mecanismos de protección contra las ERO y ERN. El fluido del tracto respiratorio, contiene una gran cantidad de antioxidantes entre los que se encuentran el

glutación reducido (GSH), el ácido ascórbico, el ácido úrico, el α -tocoferol, la ceruloplasmina entre otros⁽³⁹⁾.

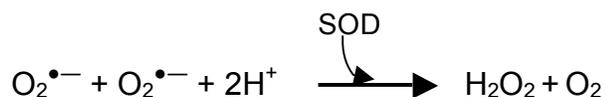
Los mecanismos de protección contra los RL incluyen tres niveles, primario, secundario y terciario⁽⁴⁰⁾, los cuales se describen a continuación:

1.15 Sistema antioxidante primario

Se encarga de evitar la formación de nuevas especies reactivas del oxígeno, en su mayoría son enzimáticos aunque también se cuenta con proteínas de unión a metales:

- **Superoxido Dismutasa (SOD)**

Se encuentra principalmente en hígado, glándulas suprarrenales, riñón y bazo. En los mamíferos se han identificado tres isoenzimas de la SOD (E.C.1.15.1.1). La isoenzima extracelular (EC-SOD), contiene dos subunidades idénticas (32 kDa), contiene un átomo de cobre y zinc en su sitio activo unido por un ligando común de His 61 y se localiza en el espacio extracelular en un 99%. La manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), es un homotetrámero (96 kDa) que contiene un átomo de Mn por subunidad, el cual se cicliza de Mn (III) a Mn (II) y *viceversa* durante la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la mitocondria y por la superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (CuZn-SOD) a nivel de citosol, constituyendo la principal fuente de H_2O_2 . Vallyathan *et al.*⁽⁴¹⁾ reportaron una concentración de SOD de 21 ± 9.0 ng/mL en BAL de sujetos sanos no fumadores con una edad promedio de 38.7 ± 1.6 años:



- **Catalasa (CAT)**

Es una enzima tetramérica del grupo hemo (EC 1.11.1.6), constituida por cuatro subunidades tetraédricas idénticas de 60 kDa; contiene 4 grupos de ferroprotoporfirinas por molécula y cuya masa molecular es de alrededor 240 kDa.

Se localiza en los peroxisomas y su función es proteger a las células del H_2O_2 intracelular, juega un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo como respuesta celular de adaptación. Reacciona con donadores de H^+ (metanol, etanol, ácido fórmico, fenol) así como con el H_2O_2 para formar agua y oxígeno molecular. En las células de BAL de sujetos sanos se reportan concentraciones de $9.6 \pm 1.3 \text{ U}/10^6 \text{ cel}^{(42)}$:



- **Glutation peroxidasa (GPX)**

La GPX (EC 1.11.1.9) tiene un peso molecular de 80 kDa y contiene un residuo de selenio-cisteína en cada una de sus subunidades el cual es esencial para su actividad. Cataliza la reducción de una variedad de hidroperóxidos (ROOH) y comparte el H_2O_2 como sustrato con la CAT. Existen al menos cuatro isoenzimas de GPX, la glutacion peroxidasa celular (cGPX o GPX1), la glutacion peroxidasa gastrointestinal o GPX2, la glutati3n peroxidasa extracelular o GPX3, la fosfolípido hidroperóxido glutacion peroxidasa (GPX4 o PHGPX)^(43,44).



Se sabe que el ciclo oxido-reductor del GSH es la principal fuente de protección contra un estrés oxidativo leve, mientras que CAT confiere protección contra un estrés oxidativo severo⁽⁴⁵⁾. Las concentraciones de GPX en BAL son de 145.47 ± 13.42 a $223.56 \pm 24.4 \text{ U}/\text{ml ELF}$ en sujetos sanos de 18 a 40 años de edad⁽⁴⁶⁾.

- **Transferrina**

Es una glicoproteína, β -globulina con peso molecular de 77 kDa. Se sintetiza en el hígado, se considera como una proteína de fase aguda que contiene 2 mol de Fe^{3+} por mol de proteína y bajo condiciones normales in vivo, se encuentra

saturada sólo al 30-35% por lo que la concentración de hierro libre en plasma es casi nula previniendo la formación de radical HO^\bullet y en consecuencia la lipoperoxidación. Dentro de la célula, el hierro es almacenado inmediatamente en la ferritina cuya capacidad de almacenamiento es de 4500 mol de hierro por mol de proteína. Este hecho previene la participación de este metal en la reacción de Fenton. A pH 6 el hierro se disocia de la ferritina, esto es importante ya que en el microambiente de las células fagocíticas puede haber un $\text{pH} < 6$. La concentración normal de transferrina en el suero es de 2-4 mg/mL. En el fluido del epitelio pulmonar (ELF) se han reportado concentraciones de esta glicoproteína de alrededor de 324 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 4.2 μM ⁽⁴⁷⁾.

- **Ceruloplasmina**

Conocida también como “la proteína azul”, fue aislada por Holmberg y Laurell en 1948 en el suero de cerdo⁽⁴⁸⁾. Es una α_2 -glicoproteína plasmática con un peso molecular de ~ 132 kDa cuyo gene se localiza en el cromosoma 3q25. Es la proteína plasmática más abundante sintetizada principalmente en los hepatocitos y funciona como transportador de átomos de cobre (Cu^{++}); se secreta unida a 6 átomos de Cu^{++} unidos fuertemente a la molécula. Además de ésta actividad, también interviene en el metabolismo del hierro, como defensa antioxidante e interviene en la angiogénesis y coagulación. Se ha demostrado que posee una actividad de ferro-oxidasa, catalizando la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , con un ciclo catalítico que involucra 4 de los 6 átomos de cobre asociados a la CP y usa al dioxígeno como aceptor de electrones mecanismo por el cual previene la reacción de Fenton⁽⁴⁹⁾. Una vez que la ceruloplasmina oxidó el hierro a la forma férrica los iones de éste se unen fuertemente a la transferrina y lo almacena⁽⁵⁰⁾. La concentración en plasma es de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en adultos y en el BAL se han estimado en 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, o aproximadamente 0.20 μM ⁽⁵¹⁾.

- **Lactoferrina**

Es una proteína de 80 kDa que se encuentra en las secreciones exocrinas y en los gránulos específicos de los neutrófilos⁽⁵²⁾. También es producida por varias células epiteliales; la lactoferrina es biológicamente activa y esta directamente relacionada

a su habilidad de ligar hierro extracelular y prevenir la lipoperoxidación. Ésta proteína está presente en el BAL a concentraciones aproximadas de 0.5 µg/mL⁽⁵³⁾ y su concentración se ha incrementado en las enfermedades inflamatorias de las vías aéreas.

1.16 Sistema antioxidante secundario

Se encargan de neutralizar la acción de los radicales libres ya formados

- **Paraoxonasa (PON)**

La paraoxonasa es una arilesterasa dependiente de Ca^{++} , que se sintetiza en el hígado; está estrechamente asociada a las APO-A de las HDL. Tiene una actividad hidrolítica importante, incluyendo metabolismo de drogas y detoxificación de agentes organofosforados. Inicialmente esta enzima se estudió extensivamente en el campo de la toxicología debido a su capacidad de hidrolizar los compuestos organofosforados como el paraoxón y gases neurotóxicos como el sarin. Actualmente se ha vinculado con el metabolismo de lípidos protegiendo a los fosfolípidos de las LDL de la oxidación por lo que se ha relacionado con la prevención de la aterosclerosis⁽⁵⁴⁾. La LDL oxidada parece inactivar la PON1 a través de interacciones entre enzima-grupos sulfhidrilo libres y lípidos oxidados que se formaron durante la oxidación de la LDL. Hay estudios que relacionan una menor actividad de la PON1 en los pacientes que sufrieron infarto del miocardio, en aquellos pacientes que sufren de hipercolesterolemia familiar y diabetes mellitus. El incremento en la actividad de la PON1 está asociado con la ingesta de polifenoles presentes en vino, el té y jugo de frutas; así como en pacientes bajo tratamiento con estatinas y fibratos. La paraoxonasa produce hidrólisis de los ésteres fosfóricos anhídridos así como uniones fluorofosfatos (P-F) y cianofosfatos (P-CN), hidroliza los hidroperóxidos formados durante la lipoperoxidación de las LDL, de esta forma interrumpen la continuidad de reacciones de una cadena de lipoperoxidación⁽⁵⁴⁾.

- **Vitamina C**

El ácido ascórbico es un micronutriente esencial para una adecuada función metabólica. La vitamina C es una lactona de seis carbonos, hidrosoluble, y es un cofactor para varias enzimas involucradas en la biosíntesis de la colágena, carnitina y neurotransmisores. Actúa como donador de electrones o agente reductor⁽⁵⁵⁾. Datos de laboratorio sugieren que también puede ser un prooxidante: la adición de vitamina C en concentraciones de hasta 0.2 mM potenció 10 μM Fe^{2+} induciendo lipoperoxidación. Concentraciones mayores a 0.2mM mostraron capacidades antioxidantes de esta vitamina⁽⁵⁶⁾.

- **Vitamina E**

Descubierta en 1922 por Evans y Bishop⁽⁵⁷⁾, como un micronutriente esencial para la reproducción en ratas, es una mezcla de cuatro tocoferoles (α , β , γ , δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ , δ) liposolubles⁽⁵⁸⁾. El α -tocoferol es el más activo de los cuatro ya que atrapa los radicales peroxilo. Las altas concentraciones de esta vitamina le confieren actividad prooxidante⁽⁵⁹⁾. Unido a la parte hidrófoba del α -tocoferol se encuentra en grupo $\text{HO}^{\bullet-}$ cuyo átomo de hidrógeno puede ser fácilmente sustraído. Los radicales peroxilo y alcoxilo generados durante la lipoperoxidación se combinan preferentemente con el antioxidante en lugar de combinarse con el ácido graso de la cadena adyacente. Esta reacción convierte al α -tocoferol en un radical tocoferol- O^{\bullet} , el cual es poco reactivo y por ende incapaz de atacar los ácidos grasos adyacentes lo que conduce a la interrupción de la reacción en cadena. El radical tocoferol migra hacia la membrana en donde reacciona con la vitamina C y se reconvierte en α -tocoferol⁽⁶⁰⁾. Se ha reportado que las concentraciones en el ELF son de 20.7 ng vit E/mL⁽⁶¹⁾.

- **Licopeno**

El licopeno es un pigmento liposoluble que proporciona la coloración roja a los jitomates y a la sandía entre otros. Se estima que más del 80% de la ingesta de licopeno proviene del jitomate incluyendo jugo de tomate, la salsa catsup, la salsa para espagueti y la salsa para pizza⁽⁶²⁾. Los β -carotenos y el licopeno, son

transportados principalmente en las LDL, protegiéndolas del daño por oxidación⁽⁶³⁾. El licopeno se ha encontrado en el tejido pulmonar humano y existe evidencia de protección contra cáncer pulmonar, aunque estudios de cohorte que se han realizado no han mostrado esta asociación, estudios de casos y controles han mostrado una disminución del riesgo con un mayor consumo de licopeno y jitomate, por lo que esta asociación necesita ser estudiada con mayor profundidad⁽⁶⁴⁾.

1.17 Sistema antioxidante terciario

La generación endógena de radicales libres durante el metabolismo celular genera daño al ADN, normalmente no patogénico y detectado en tejido sano como resultado de la interacción del HO• con el ADN. El sistema antioxidante terciario comprende enzimas que participan en la reparación de las biomoléculas así dañadas⁽⁶⁵⁾.

1.18 Asma y su relación con el estrés oxidativo

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica en la que intervienen varios elementos celulares como son los mastocitos, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. La característica de esta enfermedad es la presencia de sibilancias, tos, expectoración, opresión del tórax de predominio matutino o nocturno. Esta sintomatología se asocia a obstrucción del flujo aéreo de forma variable, el cual puede ser reversible con o sin tratamiento. La inflamación de las vías aéreas causa hiperreactividad bronquial a una variedad de estímulos⁽⁶⁶⁾.

La literatura refiere que en el tracto respiratorio de pacientes asmáticos, se presentan condiciones favorables para la generación de ERO⁽⁶⁷⁾ ya que la mayoría de las células inflamatorias que participan en el proceso asmático son capaces de producirlos, tal es el caso de macrófagos y eosinófilos que al ser activados por estímulos físicos, químicos y biológicos generan ERO. También se sabe que los leucocitos de pacientes asmáticos tienen una capacidad incrementada para

generar estas especies comparada con individuos normales⁽⁶⁸⁾. Los mecanismos inflamatorios precisos que se suscitan durante el asma, no son conocidos en su totalidad, aunque se ha sugerido la posible participación de ERO, de origen leucocitario en la fisiopatología de ésta enfermedad⁽⁶⁹⁾. Adicionalmente, se ha informado que en el paciente asmático existe una deficiencia en algunos de los mecanismos antioxidantes⁽⁷⁰⁾.

1.19 Relación de los leucocitos polimorfonucleares con el asma

Recientemente se ha involucrado a los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) como responsables de la gravedad y del difícil control de los pacientes con asma⁽⁷¹⁾. Se ha demostrado la presencia de neutrófilos en las muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de asma severa⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. También se ha observado una inflamación a expensas de neutrófilos así como un aumento de estas células en las glándulas submucosas de las vías respiratorias en pacientes que murieron así como en aquellos que requirieron ser intubados debido a la severidad del ataque de asma⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Debido a que son células especializadas en la fagocitosis, los neutrófilos también podrían verse involucrados en la patofisiología del asma dada su capacidad de generar ERO y ERN, ya que se ha demostrado que los neutrófilos que se encuentran en la circulación se encuentran activados y no se inhiben mediante la administración de corticoesteroides orales⁽⁷⁸⁾.

1.20 Biomarcadores de daño utilizados para la evaluación del estrés oxidativo

El estrés oxidativo, se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, generando un círculo vicioso que se manifiesta en forma de daño celular y tisular. La expresión clínica es fundamentalmente por medio de alteraciones funcionales locales y sistémicas (hipertensión arterial, arritmias, fibrilación, bronco-constricción, shock). El daño

molecular puede ser cuantificado en el plasma, sin embargo, algunas modificaciones inducidas por el estrés oxidativo, como son los cambios bioquímicos intracelulares (estrés intracelular), sólo pueden ser evaluadas con el auxilio de metodología especial⁽⁷⁹⁾. La Tabla 2 muestra algunos de los marcadores empleados para la evaluación del daño a biomoléculas secundario a estrés oxidativo⁽⁷⁹⁾.

Tabla 2.- Marcadores de utilidad para la evaluación del estrés oxidativo

Tipo de daño	Biomarcador
Lipoperoxidación	Malondialdehído Dienos conjugados Δ -2,4-hidroxinonenal Acroleína
Oxidación de proteínas	Carbonilos totales Disminución de SH Ditirosinas PAOP Productos de oxidación avanzada Nitro-tirosina
Rompimiento de DNA	8-hidroxi-guanina

2 JUSTIFICACIÓN

La contaminación del aire se ha asociado con un incremento en el número de exacerbaciones de las patologías respiratorias y cardiovasculares. También se ha relacionado con una disminución en la esperanza de vida, dependiente de la composición fisicoquímica y del potencial que tienen algunos de los componentes de las PM_{2.5} de generar RL y de atravesar la barrera alveolocapilar; aunado a la posibilidad de que estimulen a los neutrófilos directa o indirectamente para inducir el estallido respiratorio aumentando a su vez la formación de ERO y ERN y citocinas inductoras a su vez de una mayor generación de especies reactivas como es el caso del TNF- α . Estos hechos favorecen y/o agravaban un estado de estrés oxidativo el cual podría traducirse clínicamente en modificaciones a la evolución de la enfermedad. Por lo anterior, es conveniente estudiar la asociación directa de la contaminación del aire por PM_{2.5}, con el estallido respiratorio, y específicamente con la producción de especies reactivas del oxígeno por los polimorfonucleares de sangre periférica de sujetos con asma.

3 HIPÓTESIS

El contacto de los polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes asmáticos con las PM_{2.5}, inducirá una generación mayor de ERO y ERN y un posible daño estructural a biomoléculas afectando su función biológica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar los efectos de las PM_{2.5}, sobre los polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con asma, comparados con los de individuos clínicamente sanos.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar en pacientes con asma, la generación *in vitro* de especies reactivas del oxígeno por polimorfonucleares en contacto con PM_{2.5}.
2. Cuantificar la actividad de enzimas plasmáticas relacionadas con el estrés oxidativo y con la defensa antioxidante como son la mieloperoxidas y la paraoxonasa en pacientes con asma.
3. Evaluar la predisposición plasmática al daño oxidativo.
4. Correlacionar los marcadores de daño oxidativo y respuesta en neutrófilos, con el grado de obstrucción pulmonar determinado por los parámetros de la función pulmonar.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Tipo de estudio

Transversal, comparativo, analítico, experimental.

5.2 Variable independiente

PM_{2.5}

5.3 Variable dependiente

Determinación de: Generación de ROS y RNS por polimorfonucleares de sangre periférica, actividad plasmática de mieloperoxidasa y paraoxonasa, predisposición al daño oxidativo.

5.4 Tamaño de muestra

El tamaño muestral se determinó con base en la comparación de medias, tomando los valores de referencia para predisposición al daño oxidativo obtenidos por Torres *et al.*⁽⁸⁰⁾.

- N= No. de pacientes.
- $Z\alpha = 95\%$.
- $Z\beta = 80\%$.
- $S^2 = 157.53 \mu\text{M TBARS/mL plasma}$
- $d = 616 \mu\text{M TBARS/mL plasma}$

$$N = \frac{2s^2(Z_{\alpha/2} + Z\beta)^2}{(d)^2} \quad N = \frac{2(157.53)^2(1.96 + 0.84)^2}{(616)^2} = 1.02$$

El resultado obtenido fue de 2 pacientes por grupo.

6 SELECCIÓN DE PACIENTES

6.1 Criterios de inclusión

- Edad de 30 a 65 años
- Cualquier sexo
- Pacientes con diagnóstico de asma leve a moderada, de acuerdo a los lineamientos de la “Global Initiative for Asthma” (GINA)⁽⁸¹⁾.
- FEV₁ > 50% del predicho, estables
- Carta de consentimiento informado

6.2 Criterios de no inclusión

- Pacientes con rinitis alérgica
- Pacientes con poliposis nasal
- Embarazo
- Pacientes con diagnóstico de: cáncer, insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes, virus de inmunodeficiencia humana

6.3 Criterios de eliminación

- Plasma hemolizado
- Separación celular fallida
- Colesterolemia >250 mg/dL
- Triacilgliceridemia >250 mg/dL

7 SELECCIÓN DEL GRUPO CONTROL

7.1 Criterios de inclusión

- Edad de 30 a 65 años
- Cualquier sexo
- Residentes de la Ciudad de México.
- Carta de consentimiento informado

7.2 Criterios de no inclusión

- Padecimientos respiratorios en las seis semanas previas al estudio
- Embarazo

7.3 Criterios de eliminación

- Plasma hemolizado
- Separación celular fallida
- Colesterolemia >250 mg/dL
- Triacilgliceridemia >250 mg/dL

8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 *Reactivos*

Tris(hidroximetil)aminometano, 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidina dihidrocloruro, Ácido tiobarbitúrico, Diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon), Luminol (5-amino-2,3-dehydro-1,4-phthalazinedione), phorbol myristate acetate (PMA), ionóforo de calcio (A23187), Eserina, se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

Ácido clorhídrico, alcohol etílico, cloruro de sodio, ciclohexanona, dimetilsulfoxido, fosfato de potasio, ácido tricloroacético, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, tartrato de sodio y potasio, carbonato de sodio, de Química Meyer.

Ácido acético glacial, Sacarosa, de Control Técnico y Representaciones, CTR Scientific

Hidróxido de sodio, dextrosa, Sodio EDTA, cloruro de amonio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, de Reactivos y Productos Químicos Finos, PQF. Catalasa, butilhidroxitolueno de Merck-Schuchardt, Germany. FeCl_2 , Peróxido de hidrógeno, de Laboratorios Fermont. Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway).

8.2 *Obtención del material particulado*

Las partículas respirables [diámetro aerodinámico $< 10\mu\text{m}$ (PM_{10})] y partículas finas [$< 2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$)] se colectaron en el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA) del Instituto Nacional de Ecología (INE) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). CENICA esta situado en el sureste de la ciudad de México (zona Iztapalapa) en el campus de la Universidad Autónoma Metropolitana. Es la zona más poblada de la ciudad, cuenta con industrias alimentarias y se encuentra a menos de 2 km de distancia de la central de abastos. Los muestreadores se localizaron en el techo de un edificio de cuatro pisos.

Catorce (PM₁₀) y 13 (PM_{2.5}) muestras se obtuvieron de manera simultáneas durante un periodo de 24 horas, de mayo, 2005 a Febrero, 2006. Las muestras fueron obtenidas con un muestreador de alto volumen Andersen-Graseby sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman). Antes y después de la colecta de las muestras, los filtros se condicionaron a $22 \pm 3^\circ\text{C}$ y $40 \pm 5\%$ RH durante un periodo de 24 horas, posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, sensibilidad de 10^{-4} g). Después de haber sido pesados, se procedió a tomar un segmento del filtro que contenía las PM₁₀ para el análisis químico de acuerdo con los estándares de la USA EPA (1996 y 1998) mediante “inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy” (Perkin Elmer, 3300 DV), y espectroscopia de absorción atómica (Varian, Spectra A-2). Otra submuestra de los filtros de PM₁₀ se analizó con el microscopio electrónico (JEOL, JSM-5900 LV) acoplado con un espectrofotómetro de energía de dispersión (Oxford) con un detector de rayos X con el objetivo de conocer el diámetro de distribución así como la composición individual de las partículas. El filtro con la muestra de PM_{2.5} se “barrió” en su totalidad con ayuda de una brocha y el material obtenido mediante este procedimiento se colectó en viales de polietileno. La masa de partícula obtenida varió de 18 to 80 mg. Una vez que se colectaron las PM_{2.5} se transfirieron al Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

8.3 Obtención y procesamiento de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por personal calificado del laboratorio clínico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, D.F. Éstas se obtuvieron en tubos vacutainer (2) con heparina como anticoagulante, adicionado con 10µL/mL de sangre de BHT 2mM.

8.4 Separación de los polimorfonucleares

Se procedió a aislar los neutrófilos mediante densidad de gradiente utilizando una solución de Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)^(82,83).

Mediante este procedimiento y después de centrifugar a 2400 rpm, se obtuvieron cuatro zonas de diferente densidad (plasma, monocitos, neutrofilos, meido de separación y eritrocitos). Mediante pipetas Pasteur, se procedió a separar la primera y la tercer capa para realizar el protocolo de experimentación. Se adicionó amortiguador de Krebs-Ringer fosfato, con un pH de 7.4, enriquecido con 1 mg/mL de glucosa (K RPG) y se centrifugó nuevamente a 2400 rpmm por 5 min., se desechó el sobrenadante y para remover los restos de eritrocitos de la muestra de neutrófilos se utilizó un choque hipotónico, posterior al choque hipotónico se adicionó nuevamente K RPG centrifugándose a 2400 rpm por 5 min. Finalmente, el botón celular se resuspendió con amortiguador de K RPG a una concentración final de 1×10^6 cells/ml.

8.5 Quimioluminiscencia

La técnica de quimioluminiscencia (CL) se desarrolló de acuerdo con el método de Trush⁽⁸⁴⁾ con algunas modificaciones. La temperatura de reacción se estableció en 25°C y la lectura se realizó durante 10 minutos en un luminómetro marca Turner (20/20n Luminometer, Turner BioSystems, Sunnyvale, CA.). El luminol, se disolvió inicialmente en etanol absoluto a una concentración de 25 mM. Esta solución se almacenó en un vial oscuro a una temperatura de 4°C. En la mañana del experimento, se tomaron 2µl de esta solución y se agregaron al sistema para dar una concentración final de 100 µM. La respuesta de CL se detectó en viales de polietileno con un volumen de reacción de 0.5 mL, con 25 µl de la suspensión celular (1×10^6 cel/mL), para medir la respuesta basal. Posterior a los 10 minutos de lectura se agregó 3 µl de éster de forbol, a una concentración de 160 µM en K RPG en presencia o ausencia de 10 µl equivalentes a 20 µg de PM_{2.5}. El vial se mezcló por inversión y se realizó un conteo cada 10-sec durante un tiempo total de 10 minutos.

8.6 Determinación de los parámetros de estrés oxidativo en plasma

- **Actividad de paraoxonasa en plasma**

Antes de evaluar la actividad de la enzima, el plasma se incubó con eserina 0.66 mM por 10 min a temperatura ambiente para inhibir la actividad de la butirilcolinesterasa y prevenir una posible interferencia con la determinación de la actividad de la PON, la cual fue determinada mediante la técnica propuesta por Abbot *et al.*⁽⁸⁵⁾.

- **Actividad de mieloperoxidasa en plasma**

La actividad de mieloperoxidasa se determinó por el método de Bozeman⁽⁸⁶⁾, brevemente, se tomó 10 µl de plasma en tubos de polietileno con buffer de acetato a una concentración de 0.05 M con un pH de 5.4, enriquecido con sacarosa 0.3 M y se agregó 100 µl de tetrametilbenzidina 1.4 mM, y 100 µl peróxido de hidrógeno 3.0 mM, con y sin adición de 50 µl de la suspensión de PM_{2.5}, las muestras se incubaron a 37°C durante 10 min. Al final de este tiempo, se agregó 10 µl de catalasa a una concentración de 1300 U/ml y 100 µl de ácido acético 0.2M, posteriormente, las muestras se mezclaron con el vortex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se cuantificó a una longitud de onda de 655nm y los resultados se expresaron como unidades de MPO units. Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar un incremento de 0.1 con una absorbencia de 655 nm y a 25°C. La actividad específica se expresó en U MPO/mg proteína.

- **Predisposición al daño oxidativo**

Los fosfolípidos plasmáticos son ricos en ácidos grasos insaturados forman parte de las LDL (en un 22%) y de las HDL (en un 25-30%), éstos se analizaron en cuanto a su resistencia a un daño específico que genera sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS). En este caso, evaluamos la formación in vitro de TBARS utilizando la reacción de Fenton como generador de radicales hidroxilo (HO•) y evaluamos la cantidad de TBARS formadas. El procedimiento fue el siguiente: 5 µl de plasma se colocaron en un tubo pyrex con tapa y se adicionó

amortiguador de Tris a una concentración de 7.2 mM (pH 8.2), la mezcla se incubó a 37°C durante 15 min en presencia de H₂O₂ a una concentración de 5 μM y 5 μM de FeCl₂. Al final de la incubación, se adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0.375% en 0.2 N HCl y se mezcló por vórtex, se puso a ebullición durante 15 min. Una vez que la muestra alcanzó la temperatura ambiente se adicionó 0.5 ml de HCl 0.2 M, y le leyó a una longitud de onda de 532 nm. Los valores obtenidos se expresaron como TBARS μM por mililitro de plasma. El 1,1,3,3-tetrametoxipropano a una concentración de 0.1 mM en ácido sulfúrico 1% se utilizó como estándar⁽⁸⁷⁾.

8.7 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± desviación estándar. Se aplicó la prueba de t pareada para comparar dos grupos (antes y después) y la prueba de ANOVA la comparación múltiple de Bonferroni se utilizó para la comparación intergrupala. La diferencia se consideró significativa con una $p < 0.05$. Los datos se analizaron con ayuda del paquete estadístico GraphPad Prism software (versión 5.0 para Windows; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

8.8 Aspectos éticos

Este estudio se realizó con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; Título segundo, Capítulo I, Artículos 13, 14 y 17. Categoría II. Se considera que es una investigación con riesgo mínimo derivado de procedimientos comunes como son exámenes físicos y la extracción de sangre por punción venosa.

9 RESULTADOS

9.1 Características clínicas de la población de estudio

Las características clínicas de los sujetos del grupo control y de los pacientes con asma se muestran en la Tabla 3. Los pacientes con asma se encontraban estables en el momento del estudio. Aunque algunos datos de laboratorio de los pacientes mostraron diferencias estadísticamente significativas comparados con el grupo control, los parámetros de laboratorio no superaron los valores estándar establecidos por el laboratorio clínico de la Institución.

Tabla 3- Características clínicas de la población de estudio

	Grupo control	Grupo Asma	Valor de p
N	11	06	
Género	♀ 7 ♂ 04	♀ 06	
Edad	43.5 ± 6.3	49.4 ± 11.5	0.1422
IMC	26.3 ± 3.4	29.6 ± 2.2	0.0721
FVC%	95.0 ± 12.2	90.4 ± 18.2	0.5407
FEV₁%	99.4 ± 12.3	83.6 ± 21.5	0.0702
FEF₂₅₋₇₅%	112.9 ± 23.9	54.11 ± 23.2	0.0002

9.2 Características del material particulado

Las concentraciones de PM medidas en CENICA fueron de 73 y de 32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, respectivamente. La concentración promedio de 24 horas en este estudio se encontró por debajo de los estándares mexicanos de calidad de aire para PM_{10} (120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and $\text{PM}_{2.5}$ (65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), sin embargo estas concentraciones excedieron el estándar anual de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para PM_{10} y 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para $\text{PM}_{2.5}$ (Figura 4). Los datos obtenidos durante esta campaña de monitoreo, mostraron variaciones estacionales. La fracción de $\text{PM}_{2.5}$ contribuyó de un 49 a 47 % a la fracción de PM_{10} durante la estación de lluvia (Mayo-Junio) y de 31 a 38% durante la estación seca (Enero-Febrero) debido a los efectos de la resuspensión y erosión del suelo, el cual contribuye al incremento en la fracción de PM_{10} (Figura 5). En el filtro de la fracción de PM_{10} se evaluaron metales, incluyendo el Cu, Fe y Zn; la

concentración promedio encontrada fue de 0.193, 0.838 y 0.127 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente. Se encontró una variabilidad en la masa de estos elementos probablemente debido a las variaciones climatológicas y estacionales, por ejemplo, el Fe como indicador de partículas provenientes del suelo, se incrementó dos veces durante la estación de secas y tuvo una correlación con las PM_{10} ($p < 0.05$); el Zn y el Cu no mostraron una clara asociación entre ellos, sin embargo, el 14 de mayo, ocurrió un episodio aparente de Cu-Zn. El Zn mostró un ligero incremento durante la estación de secas contrariamente a las concentraciones de Cu, (Figura 5). Con la finalidad de conocer la composición de las muestras de $\text{PM}_{2.5}$, las muestras de filtros de PM_{10} fueron analizadas con el microscopio electrónico de reflexión de superficie, se seleccionaron y analizaron 216 partículas individuales, se evaluaron manualmente utilizando el microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX). Se realizó un registro individual de la forma y tamaño de las partículas, la caracterización cuantitativa y semicuantitativa, porcentaje de carbón, oxígeno, S, Fe, y Cu. La información obtenida se presenta en la Tabla 4. Las partículas mostraron diversas formas incluyendo esferas (1, 3 y 8), aglomerados (2, 4 y 7), placas (5 y 6) y formas reticulares (9) las cuales correspondieron a partículas PM_{10} (indicadas por los números 1-5) y la fracción fina (6-9), (Figura 6). Estos análisis mostraron que el carbón y el oxígeno fueron los principales componentes, derivados de contenido mineral y de la combustión incompleta de combustibles fósiles; El S se observó solamente en los aglomerados ($< 4.1\%$) y las formas irregulares ($< 12\%$) en la fracción PM_{10} y en la fracción fina se observó sólo en las formas irregulares constituyendo menos del 2% de su contenido. Además, se detectó la presencia de elementos metálicos como hierro y cobre, el primero alcanzó el mayor porcentaje en las formas irregulares y en los aglomerados en ambas fracciones y el segundo; se encontró en todas las categorías de la fracción fina a excepción de la forma de aglomerados y contribuyó con menos del 3% y 1.5% en las fracciones gruesa y fina respectivamente. La presencia del contenido de Fe y Cu en los agregados de hollín y las formas esféricas de la fracción fina son indicativas de una combinación de la fuente natural y antropogénica influenciada por la presencia de emisiones originadas por incineradores y fundidoras en el área de estudio.

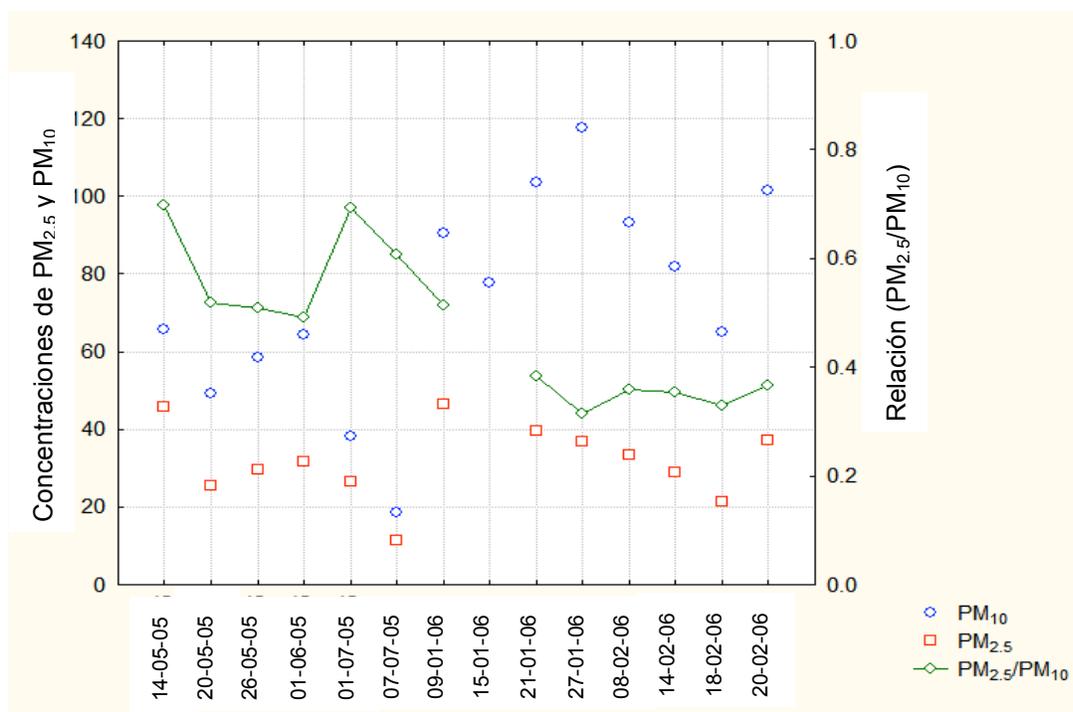


Figura 4 - Material particulado colectado en CENICA

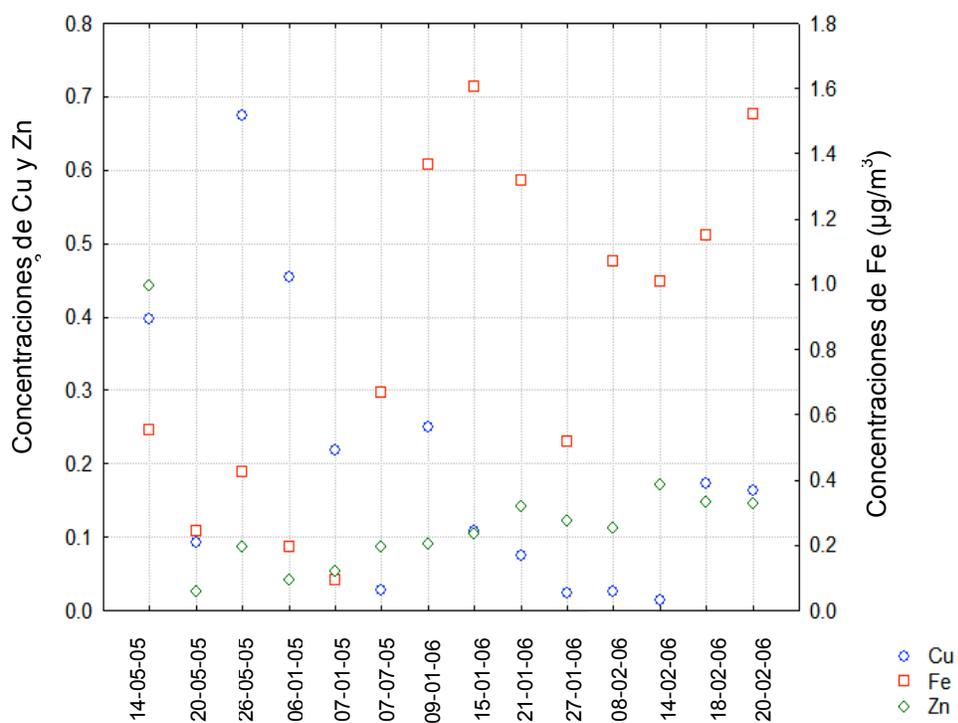


Figura 5 - Composición metálica de las PM_{10} colectadas en CENICA

Tabla 4- Clasificación individual de PM₁₀ por microscopía electrónica de barrido

PM ₁₀ fracción gruesa (diámetro > 2.5 < 10 µm)								
Elementos	Esférica N = 13		Aglomerados N = 45		Irregulares N = 86			
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
C	26.5	68.6	17.2	60.0	14.2	59.1		
O	25.6	45.0	25.7	44.8	11.9	49.4		
S	nd	nd	0.8	4.1	3.8	12.0		
Fe	0.4	1.9	0.3	12.0	0.4	11.8		
Cu	0.4	1.0	0.7	1.5	0.4	3.6		
PM _{2.5} fracción fina (diámetro < 2.5 µm)								
Elementos	Esféricos n = 12		Aglomerados n = 10		Irregulares n = 28		Agregados de Hollín n = 22	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
C	13.0	60.2	20.6	55.8	18.8	44.1	23.3	54.0
O	27.2	43.5	30.0	44.3	25.8	51.3	21.5	41.9
S	nd	nd	nd	nd	0.5	1.9	nd	nd
Fe	0.6	3.1	0.7	3.3	0.4	2.3	0.4	0.9
Cu	0.5	1.0	nd	nd	0.7	1.2	0.5	1.5

nd= no detectado

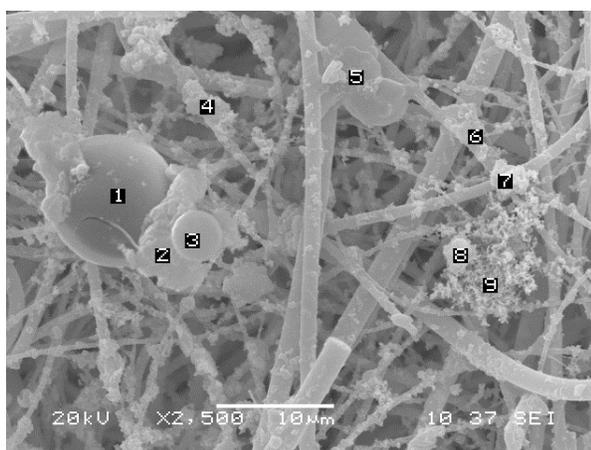


Figura 6 – Microfotografía de partículas respirables colectadas en CENICA

Números 1, 3 y 8 corresponden a esferas; números 2, 4 y 7 corresponden a aglomerados; 5 y 6 placas; numero 9 corresponde a la forma reticular. Números 1-5 corresponden a la fracción gruesa y los números 6-9 a la fracción fina

9.3 Generación in vitro de especies reactivas del oxígeno por los polimorfonucleares

La generación in vitro de ERO se evaluó mediante quimioluminiscencia (QL) y se expresó como área bajo la curva (ABC). La QL ABC de las muestras de NGC y de NGA en condiciones basales fue de $3.425 \times 10^6 \pm 2.018 \times 10^6$ y de $2.044 \times 10^6 \pm 1.462 \times 10^6$, respectivamente, como consecuencia del metabolismo normal. La adición de $PM_{2.5}$ no estimuló la QL en NGC ($3.425 \times 10^6 \pm 2.018 \times 10^6$ vs. $2.889 \times 10^6 \pm 2.894 \times 10^6$). En el grupo NGA, se produjo un incremento de casi tres veces en la respuesta de QL, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo, $p = 0.07$ ($2.044 \times 10^6 \pm 1.462 \times 10^6$ vs. $5.623 \times 10^6 \pm 4.678 \times 10^6$) (Figura 7-A). Cuando se consideró la respuesta individual en cada uno de los grupos, los NGC mostraron una disminución en la respuesta posterior a la adición de $PM_{2.5}$ cuando se comparó la respuesta basal (por ejemplo, la respuesta de las células de un individuo sano fue de 1.148×10^6 vs. 0.157×10^6) antes y después de la adición de las partículas, mientras que la respuesta en las células de un individuo asmático después de adicionar las $PM_{2.5}$ fue mayor (2.63×10^6 vs. 3.74×10^6) (Figura 7-B).

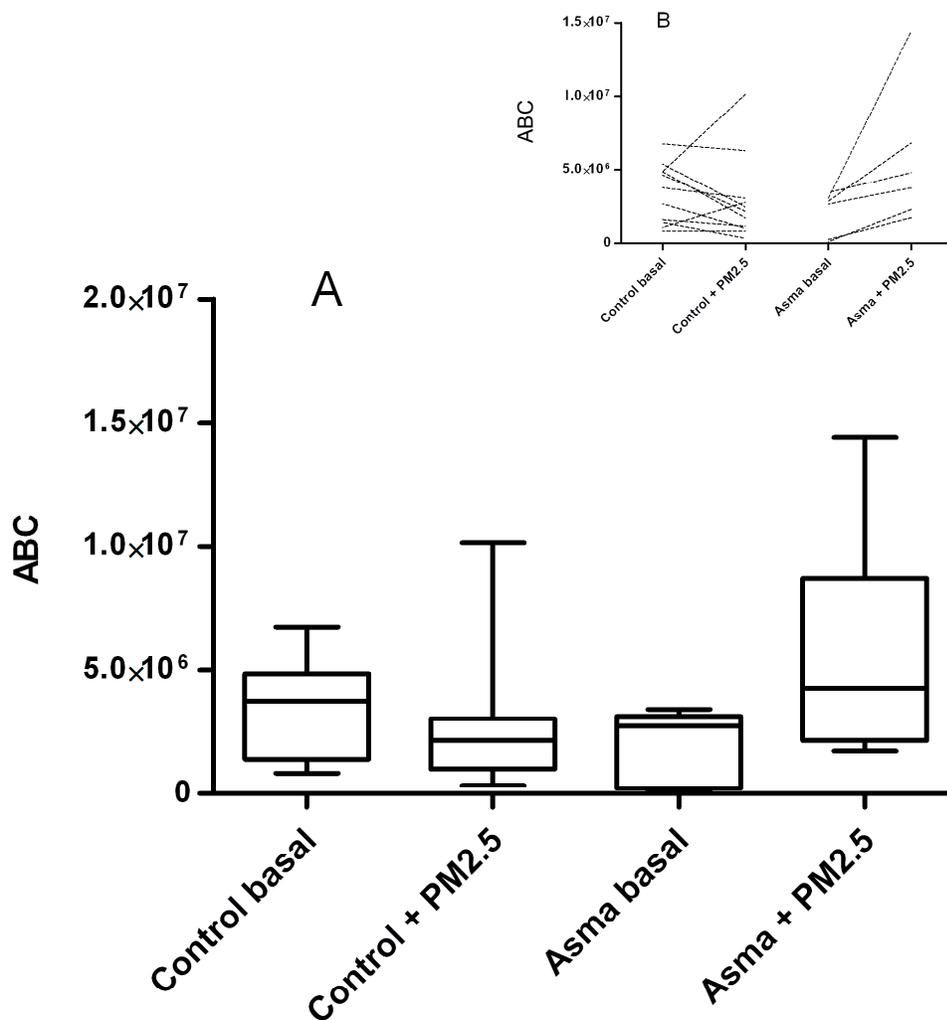


Figura 7 – Generación in vitro de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por polimorfonucleares en contacto con PM_{2.5}.

A. Producción in vitro de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por neutrófilos del grupo control (NGC) comparado con el grupo asma (NGA), evaluados por quimioluminiscencia y expresados como área bajo la curva (ABC). La gráfica representa la media del ABC para cada grupo

B. Cada línea representa la respuesta de quimioluminiscencia para cada sujeto que participó en el estudio, antes a y después del tratamiento con PM_{2.5}. El patrón muestra un incremento en la respuesta en el grupo NGA

9.4 Actividad plasmática de la mieloperoxidasa

La Tabla 5 muestra la actividad de la MPO expresada como unidades/mg proteína (1 U = ΔA 0.01/min a 655 nm). La actividad enzimática incrementó 2.18-veces en el grupo de asmáticos comparada con el grupo control ($p < 0.05$). Con el fin de normalizar los datos, hicimos una relación con los datos de la actividad de la MPO en el plasma con la respuesta de CL dado que la MPO se encuentra en los neutrófilos, este parámetro reflejaría una atenuación de la activación de los neutrófilos en ambos grupos (Figura 8).

Tabla 5- Características bioquímicas del grupo control y del grupo de asma

	Grupo control	Grupo asma	Valor de p
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0.13 \pm 0.04	0.42 \pm 0.17	< 0.0001
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	3.11 \pm 0.55	3.84 \pm 0.74	0.0364
APO-A (mg/dL)	133.3 \pm 19.93	165.0 \pm 27.59	0.0150
MPO (U/mg proteína)	24.17 \pm 18.21	52.58 \pm 25.44	0.0250
PON (nmol p-nitrofenol/mg APO-A)	0.07 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.0005
TBARS (μM TBARS/mL plasma)	157.6 \pm 115.4	497.6 \pm 234.3	0.0008

Los valores se expresan en medias \pm desviación estándar

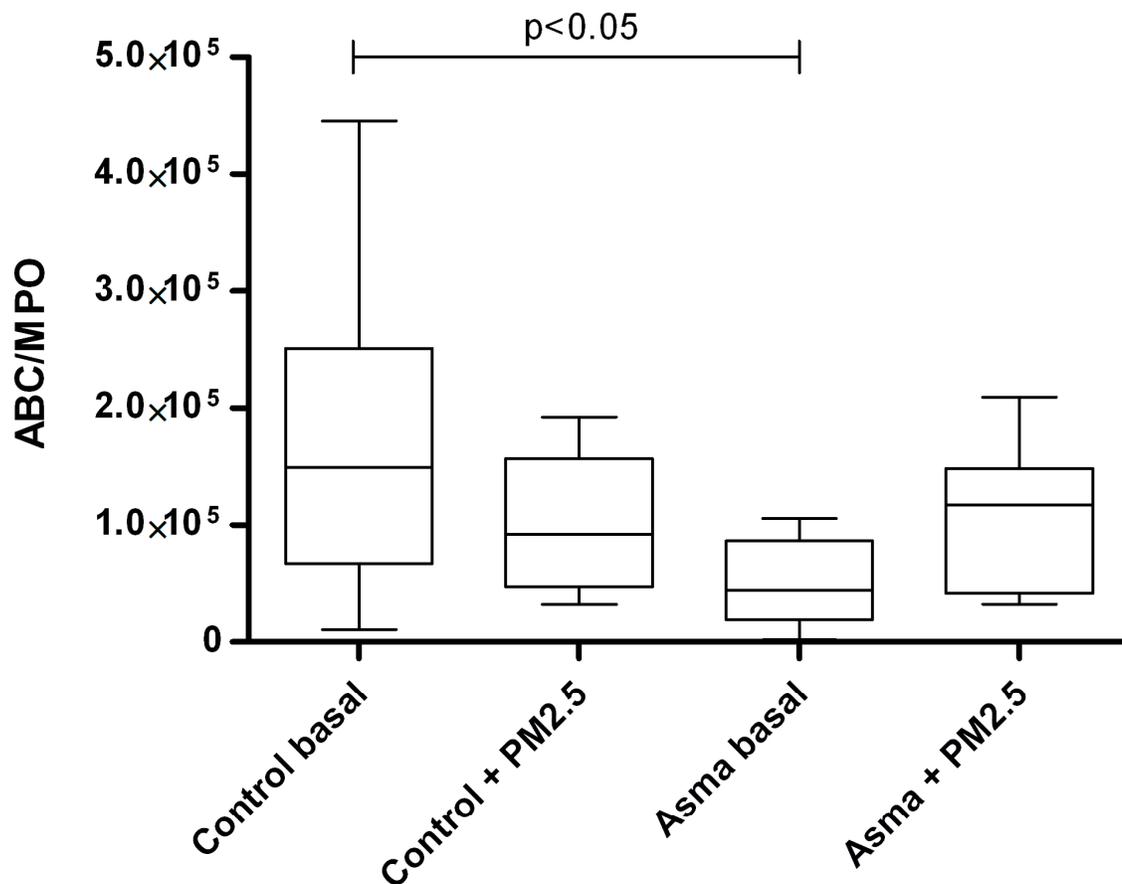


Figura 8 – Relación área bajo la curva/actividad de mieloperoxidasa (ABC/MPO) para el grupo de asma comparado con el grupo control

La relación muestra un incremento en la respuesta inflamatoria de las células expuestas a PM2.5, contrariamente a la disminución observada en el grupo control

9.5 Actividad plasmática de la paraoxonasa

La actividad de paraoxonasa se expresó como nmol de p-nitrofenol fosfato formado por miligramo de apolipoproteína A (Tabla 5). La actividad de la paraoxonasa disminuyó 3.5 veces en pacientes con asma comparado con el grupo control ($p < 0.001$). Se normalizó la actividad de la paraoxonasa de la misma manera que para la MPO (Figura 9).

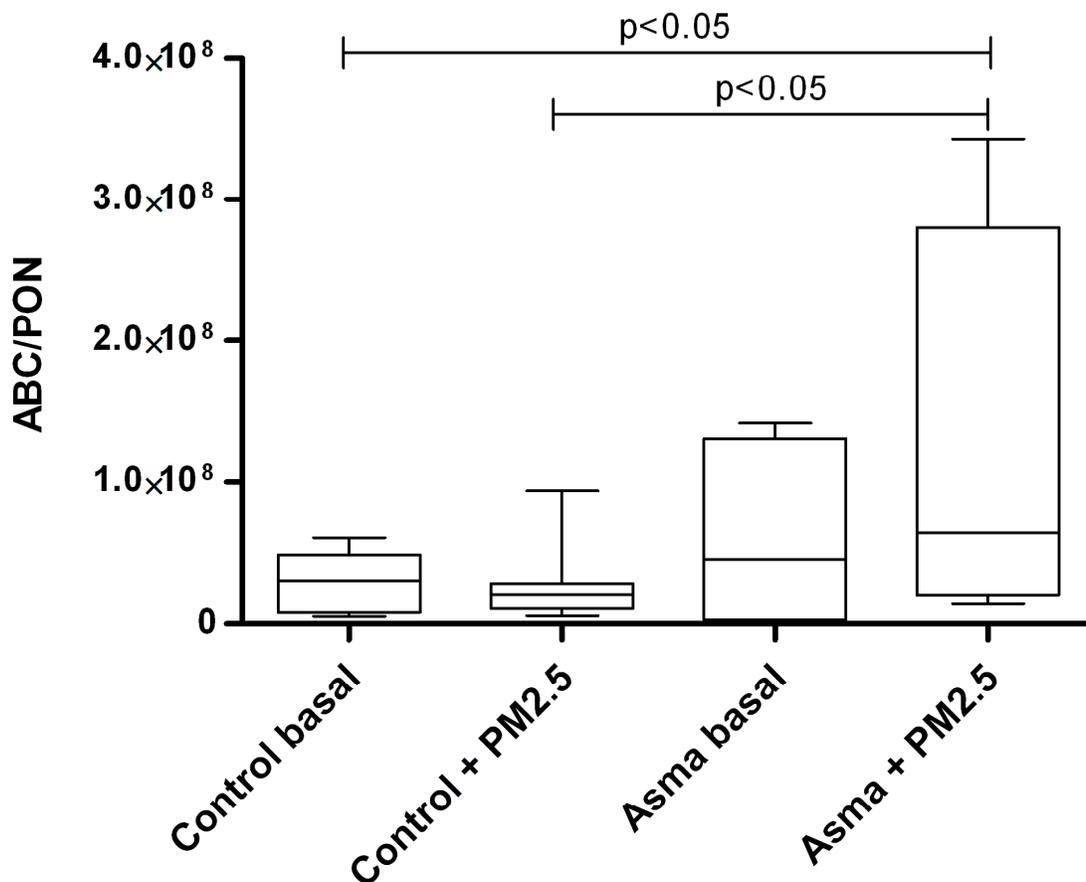


Figura 9 - Relación del área bajo la curva/actividad de paraoxonasa (ABC/PON) para el grupo de asma comparado con el grupo control

La gráfica muestra la generación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en función de la protección enzimática, la cual se ve alterada en el grupo de asma

9.6 Predisposición a la liperoxidación del plasma

La Tabla 5 también muestra la formación in vitro de TBARS como resultado de la liperoxidación de alícuotas de plasma, mediante la reacción de Fenton. La formación de TBARS se expresó como μmol por mL de plasma, en el grupo de pacientes con asma la formación de TBARS se incrementó 3 veces comparado con el grupo control ($p < 0.001$) (Figura 10). Debido a que la respuesta se vio

incrementada en el grupo de pacientes con asma, decidimos comparar este parámetro con los de estrés oxidativo con el fin de determinar una respuesta general.

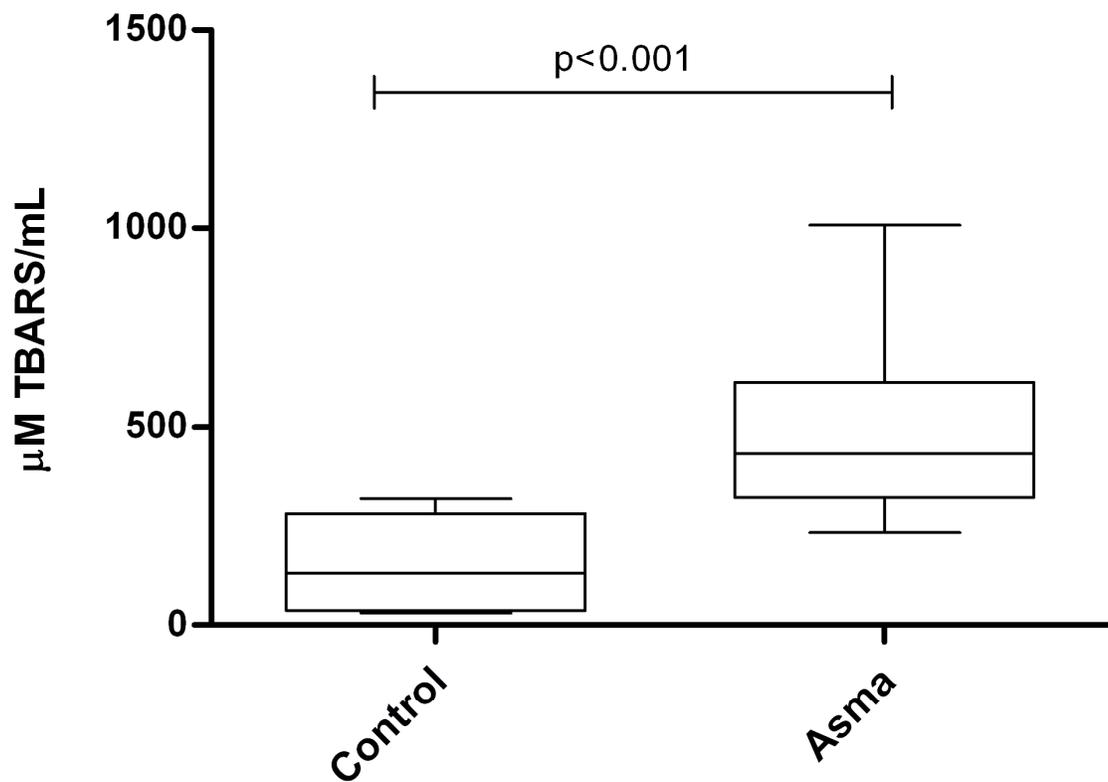


Figura 10.- Susceptibilidad del plasma a la lipoperoxidación

La gráfica muestra una mayor susceptibilidad del grupo de asma a la lipoperoxidación como consecuencia del estrés oxidativo

10 Discusión

La generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que funcionan como radicales libres con función oxidante monoeléctrica forma parte de diversos procesos fisiológicos. Entre los eventos descritos que están asociados se destacan los casos de fusiones celulares inducidas por ERO como parte de los procesos de ovulación, fecundación e implantación del cigoto de mamíferos. Por otro lado, la generación de ERO y su control antioxidante se considera en la actualidad como un proceso asociado a la homeostasis, como puede constatarse con los mecanismos implementados por el aparato respiratorio para protegerse de las alteraciones producidas por los gases tóxicos a que está expuesto, uno de esos mecanismos es a través de los sistemas antioxidantes⁽⁸⁸⁾ que incluyen una respuesta sistémica de adaptación contra la contaminación del aire, como fue demostrado por nuestro grupo al reportar una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y un aumento en la producción de TBARS en 21 voluntarios sanos que nunca antes habían vivido en la ciudad de México, comparados con individuos que siempre habían vivido en esta ciudad⁽¹⁷⁾. Por otro lado, después de 16 semanas de exposición a los contaminantes del aire de la ciudad de México, el grupo de estudio incrementó su capacidad antioxidante del plasma y disminuyó la lipoperoxidación, presentando valores similares a los de individuos que habían permanecido expuestos a la atmósfera contaminada por varios años⁽¹⁶⁾. Entre los eventos biológicos mediados por ERO, se encuentran factores o moléculas de señalización importantes que están involucradas en el daño y muerte celular. Considerando que el aparato respiratorio representa el primer sistema fisiológico expuesto a la contaminación del aire, decidimos estudiar el impacto biológico de los contaminantes en un proyecto relacionado con pacientes respiratorios entre los que destacan los pacientes con asma, en los que por datos clínicos y experimentales se ha sugerido que los oxidantes tienen una participación importante en la patogénesis de esta enfermedad así como en otras alteraciones respiratorias⁽⁸⁹⁾ En particular, hay evidencias que demuestran que durante la inflamación crónica típica del asma se incrementa el estrés oxidativo en

las vías respiratorias. Entre los mecanismos desencadenantes de asma se incluyen las infecciones virales y los contaminantes del aire que pueden activar la producción de ERO, teniendo como resultado un aumento de la inflamación redundando en las características de comportamiento de la sintomatología del asma⁽⁹⁰⁾.

De los resultados presentados en la figura 7, podemos considerar que la capacidad para mantener la generación basal de ERO en respuesta al reto con partículas en los neutrófilos de voluntarios sanos ($3.425 \times 10^6 \pm 2.018 \times 10^6$ vs. $2.889 \times 10^6 \pm 2.894 \times 10^6$) podría ser debida a la eficiente captación de las partículas por las células que rápidamente fagocitan las que son insolubles⁽⁹¹⁾. Aunque la respuesta no fue estadísticamente significativa probablemente debido al tamaño de la muestra, los neutrófilos de los pacientes asmáticos prácticamente triplicaron su respuesta in vitro al ser expuestos a las $PM_{2.5}$ ($2.044 \times 10^6 \pm 1.462 \times 10^6$ vs. $5.623 \times 10^6 \pm 4.678 \times 10^6$). Esta respuesta podría estar relacionada con la activación de citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$ e $IL-6$ ^(92,93), los cuales son factores que disminuyen la capacidad fagocítica^(94,95) de los neutrófilos de estos pacientes. El mecanismo mediante el cual las partículas alteran la capacidad fagocítica no está completamente dilucidado y en la actualidad es aún tema de controversia. Algunos grupos han argumentado que este daño podría estar relacionado a la carga catiónica en las $PM_{2.5}$ debido a la presencia de los metales de transición contenidos en las partículas como es el caso del Fe y el Cu⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Por otro lado, se ha propuesto que los componentes orgánicos y el carbón negro contenidos principalmente en las partículas ultrafinas confieren una mayor toxicidad in vivo e in vitro comparadas con las partículas finas, y que este efecto es independiente del contenido metálico soluble⁽⁹⁹⁾. La importancia de la carga en las moléculas xenobioticas está relacionada con la afinidad de los receptores scavenger por el material extraño⁽¹⁰⁰⁾; la internalización parece estar incrementada en las células previamente expuestas a las partículas. El incremento significativo en la actividad de la MPO en el plasma de pacientes con asma comparado con el grupo control (52.58 ± 25.44 vs 24.17 ± 18.21 U MPO/mg de proteína) (Tabla 4), sugiere un posible incremento en el riesgo de desarrollar crisis de asma en estos pacientes debido a una menor biodisponibilidad de óxido nítrico dado que este gas

es un sustrato fisiológico para las peroxidasas y utiliza como cosustrato al H_2O_2 ⁽¹⁰¹⁾. Por otra parte, el H_2O_2 es utilizado por la MPO para generar intermediarios reactivos capaces de iniciar la lipoperoxidación y el daño a proteínas a través de la reacción de cloración que permite la generación de aldehídos reactivos que a su vez incrementan la posibilidad de daño celular^(102,103). Adicionalmente, los pacientes con asma mostraron una disminución significativa en la actividad de la paraoxonasa 0.02 ± 0.02 comparado con 0.07 ± 0.02 del grupo control indica la posibilidad de que la capacidad enzimática que permite interrumpir la cadena de lipoperoxidación al hidrolizar los lipoperoxidos formados, está disminuida en estos pacientes. Además en nuestros resultados destaca que la síntesis hepática de apo-A se incrementó en los pacientes asmáticos, tal vez como mecanismo compensatorio (133.3 ± 19.93 vs 165.0 ± 27.59 ; $p=0.015$). Sin embargo, a pesar de este incremento, la actividad de PON fue menor en estos pacientes posiblemente como resultado también de un incremento en la actividad de la MPO, la cual ha mostrado, en varios estudios la capacidad de oxidar la tirosina 192 de la apo-A⁽¹⁰⁴⁾, y se ha considerado como un factor de riesgo para el síndrome coronario agudo⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾. A esta capacidad para oxidar a la apo-A podría atribuirse la disminución en la actividad de la PON. Evidencias epidemiológicas, clínica y experimentales relacionan las concentraciones ambientales de contaminantes con alteraciones respiratorias y cardiovasculares, que se pueden relacionar con los efectos agudos tóxicos resultado de la contaminación del aire incluyen cambios en la función pulmonar, frecuencia cardiaca, presión arterial y en el estado inflamatorio. Las consecuencias clínicas de dichos efectos incluyen síntomas respiratorios trombosis, infarto del miocardio, arritmias y embolia, en los que el estrés oxidativo agudo, la inflamación, la inducción de estados protrombóticos así como disfunción de sistema nervioso autónomo parecen tener una participación importante^(109,110). Con base en las evidencias anteriores y en nuestros resultados, podemos sugerir que algunos componentes de $\text{PM}_{2.5}$ interactúan con los receptores membranales activando la NADPH oxidasa e incrementando la generación de ERO en el grupo de pacientes asmáticos. A diferencia del grupo control, el grupo de pacientes asmáticos fue probablemente incapaz de contrarrestar la generación de ERO debido a los mediadores

inflamatorios prevalentes en su enfermedad aunado al estado de estrés oxidativo demostrado por el incremento en la actividad de la MPO y la mayor predisposición a la lipoperoxidación además de la disminución en la actividad de la PON. La reducción en la actividad de la PON indica una inflamación generada por una disminución en la capacidad de los neutrófilos de los pacientes con asma para modular las ERO (Figura 6). Esta respuesta se ve reflejada en una mayor susceptibilidad para la lipoperoxidación en esos pacientes (Figura 7). El aumento en la generación de ERO en estos pacientes podría estar relacionada con una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico, provocando un incremento en la susceptibilidad a las crisis asmáticas inducidas por la contaminación del aire.

11 Conclusiones

Con base en los resultados aquí presentados y en las evidencias experimentales comunicadas por otros grupos de investigación, podemos concluir que se presentó una respuesta dual en la generación de ERO y ERN por los neutrófilos de pacientes con asma y sujetos sanos expuestos a las $PM_{2.5}$. Nuestros hallazgos sugieren que las $PM_{2.5}$ afectan a los neutrófilos directamente induciendo un incremento en la generación de ERO y ERN en los pacientes asmáticos. Los neutrófilos de los pacientes asmáticos se mostraron incapaces de modular su respuesta ante el estímulo con las partículas, debido a su estado de estrés oxidativo secundario a un estado inflamatorio sostenido. Este hecho se relaciona con el aumento en la actividad de la MPO, una disminución en la actividad de la PON y la mayor susceptibilidad a la lipoperoxidación, podrían favorecer las infecciones bacterianas así como un incremento en el riesgo para presentar crisis de asma. Existe la posibilidad de que exposiciones prolongadas y a mayores concentraciones de contaminantes probablemente se induzca un daño molecular de mayor magnitud en la población expuesta, este daño incluye efectos bien documentados de estrés oxidativo como son: la modificación de hormonas circulantes que se traducen por alteración en sus funciones^(110,111), falta de reconocimiento de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) debido a la oxidación de la apo B-100⁽¹¹²⁾, daño celular y lesión tisular. Son necesarios estudios mas detallados con respecto a las vias de señalización específicas para la inducción de la degranulación y/o los mecanismos de la internalización bacteriana y de las partículas finas y ultrafinas proporcionarían un mejor entendimiento sobre los mecanismos mediante los cuales las partículas ejercen su efecto tóxico.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Molina LT and Molina MJ. Cleaning the air: a comparative overview, In: Air Quality in the Mexico Megacity. An integral Assessment, edited by: Molina LT and Molina MJ. Kluwer Academic, Neatherlands, 384 pp. 2002.
2. <http://www.inegi.gob.mx/entidades/espanol/fdf.html>, 1998.
3. Foy B., Varela, JR., Molina,LT., Molina, MJ. Rapid ventilation of the Mexico city basin and regional fate of the urban plume. Atmos. Chem. Phys., 6:2321-2335;2006.
4. Gestión ambiental del Aire en el Distrito Federal. Avances y Propuestas 2000-2006. <http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/gaa/03.pdf>
5. Amdur MO. Chapter 25. Air pollutants. In Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. Amdur, MO., Doull, J., Klaassen, edit. Fourth edition. Pergamon Press. pp 854-871. 1991.
6. Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional. Investigación sobre Calidad del Aire. Instituto Nacional de Ecología. http://www.ine.gob.mx/dgicur/calair/cont_criterio.html
7. Raabe, O. Deposition and clearance of inhaled aerosols. In: Mechanisms in Respiratory Toxicology. Volume I. Witschi, H. and Nettekheim, P. Edit. CRC Press Inc. pp. 223;1982.
8. Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A Renwick, L., MacNee, W. Ultrafine particles. Occup Environ Med 58:211-216; 2001.
9. Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. J Toxicol Environ Health. 65A:1531-1543; 2002.
10. Pope, CA 3rd., Burnett, RT., Thurston, GD., Thun, MJ., Calle, EE., Krewski, D., Godleski, JJ., Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. Circulation. 109:71-7;2004.
11. Gordon, T., Amdur MO. Chapter 12. Responses of the respiratory system to toxic agents. In Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of

- poisons. Amdur, MO., Doull, J., Klaassen, edit. Fourth edition. Pergamon Press. pp 383-406. 1991.
12. Yeh, H.C. Phalen, T.R.F. and Raabe, O.G. Factors Influencing the Deposition of Inhaled Particles. *Environ Health Perspect* 15:147-156; 1976.
 13. Nicod, LP. Lung defences: an overview. *Eur Respir Rev* 14:45-50;2005.
 14. Ren, C., Tong, S. Health effects of ambient air pollution. Recent research development and contemporary methodological challenges. *Environ Health* 6:56-65; 2008.
 15. Enomoto, M., Tierney, WJ., Nozaki, K., Risk of human health by particulate matter as a source of air pollution. Comparison with tobacco smoking. *J Toxicol Sci* 33:251-67;2008.
 16. Hicks, JJ., Medina-Navarro, R., Guzmán-Grenfell, A., Wacher, N., Lifshitz, A. Possible effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and serum lipoperoxides in the human adult. *Arch Med Research* 27:145-149;1996.
 17. Medina-Navarro, R., Lifshitz, A., Wacher, N., Hicks, JJ. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch Med Research* 28:205-208;1997.
 18. Escamilla-Nuñez, MC., Barraza-Villarreal, A., Hernandez-Cadena, L., Moreno-Macias, H., Ramirez-Aguilar, M., Sienna-Monge, JJ., Cortez-Lugo, M., Texcalac, JL., del Rio-Navarro, B., Romieu, I. Traffic-related air pollution and respiratory symptoms among asthmatic children, resident in Mexico City: the EVA cohort study. *Respir Res.* 9:74-83;2008
 19. Calderon-Garciduenas, L., Mora-Tiscareno, A., Fordham, LA., Chung, CJ., Valencia-Salazar, G., Flores-Gomez, S., Solt, AC., Gomez-del Campo, A., Jardon-Torres, R., Henriquez-Roldan, C., Hazucha, MJ., Reed, W. Lung radiology and pulmonary function of children chronically exposed to air pollution. *Environ Health Perspect.* 114:1432-1437;2006.
 20. Calderon-Garciduenas, L., Mora-Tiscareno, A., Fordham, LA., Chung, CJ., Garcia, R., Osnaya, N., Hernandez, J., Acuna, H., Gambling, TM., Villarreal-Calderon, A., Carson, J., Koren, HS., Devlin, RB. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part 1. Respiratory pathology. *Toxicol Sci* 61:342-55;2001.

21. Romieu, I., Meneses, F., Ruiz, S., Sienna, JJ., Huerta, J., White, MC., Etzel, RA. Effects of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 154:300-307;1996.
22. Miller, KA., Siscovick, DS., Sheppard, L., Shepherd, K., Sullivan, JH., Anderson, GL., Kaufman, JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356:447-58;2007.
23. Brook, RD., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, SCJr, Tager, I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109:2655–2671;2004.
24. Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 26:339-62;2008.
25. Li, N., Xia, T., Nel, AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med.* 44:1689-99;2008.
26. Olivares Corichi, IM., Guzmán Grenfell, AM., Medina Navarro, R., Hicks Gómez, JJ. Capítulo 39. Especies Reactivas del Oxígeno (ERO): bioquímica inorgánica y biomedicina. En: *Bioquímica Juan José Hicks Gómez*. Edit. McGraw Hill segunda edición pp 689-708; 2007.
27. Aust, AE. Chapter 1. Reactive Oxygen/Nitrogen species generation and reactions in the lung. In *oxygen/nitrogen radicals. Lung injury and disease*. Vallyathan, V., Shi, X., Castranova, V. Edit. Marcel Dekker. Inc. pp 1-34; 2004.
28. Martin, B., Wright, J., Tommasen, H., Hogg, J. The effects of pulmonary blood flow in the exchange between the circulating and marginating pool of polymorphonuclear leukocytes in dog's lungs. *J Clin Invest* 69:1277-1285;1982.

29. Stein-Steilei, J., Toews, GB. Leukocytes in the lung. In: Massaro D, ed Lung Cell Biology. New York: Marcel Dekker, pp. 441-485;1989.
30. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed 1999. Oxford, Oxford University Press.
31. Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl Microbiol* 3:3-8;2000.
32. Oliver, CN. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 253:62-72;1987.
33. Telci, A., Cakatay, U., Kayali, R., Erdoğan, C., Orhan, Y., Sivas, A., Akçay, T. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 32:40-3; 2000.
34. Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., and Kamp, DW. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:180-7;2003.
35. Sies, H. Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, New York. pp 15-21;1991.
36. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Oxidative stress. In *Free Radicals in Biology and Medicine* Ed 4 Clarendon Press, Oxford. pp. 2006.
37. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35:1147-1150;2007.
38. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes. Washington. DC:National Academy Press. 1998.
39. Cantin, AM., North, SL., Hubbard, RC., Crystal, RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 63:152-7;1987.
40. Yu, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74:139-162;1994.
41. Vallyathan, V., Goins, M., Lapp, LN., Pack, D., Leonard, S., Shi, X., Castranova, V. Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miner. *Am J Respir Crit Care Med* 162:958-965;2000.
42. Hilbert, J. and Mohsenin, V. Adaptation of Lung Antioxidants to Cigarette Smoking in Humans. *Chest* 110:916-920;1996.

43. Matés, JM., and Sánchez-Jiménez, F. Antioxidants enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 4:339-345;1999.
44. Arthur, J.R. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57:1825-1835;2000.
45. Yan, H. and Harding, JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 328:599-605;1997.
46. Avissar, NE., Reed, CK., Cox, C., Frampton, MW., Finkelstein, JN. Ozone, but not nitrogen dioxide, exposure decreases glutathione peroxidases in epithelial lining fluid of human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:1342-7;2000.
47. Rennard, SI., Gasset, G., Lecossier, d., O'Donnell, KM., Pinkston, P., Martin, PG., Crystal, RG. Estimation of the volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 60:532-538;1986.
48. Giurgea, N., Constantinescu, MI., Stanciu, R., Suci, S., Muresan, A. Ceruloplasmin-acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. *Med Sci Monit* 11:48-51;2005.
49. Bast, A., Haenen, GRMM., Doelman, CJA. Oxidants and antioxidants: State of the Art. *Am J of Med* 91: 2S-13S;1991.
50. Goldstein, IM., Kaplan, HB., Edelson, HS., Weissman, G. Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 254:4040-4045;1979.
51. Pacht, ER., Davis, WB. Role of transferrin and ceruloplasmin in antioxidant activity of lung epithelial lining fluid. *J Appl Physiol* 64:2092-2099;1988.
52. Ward, PA., Hill, GO., Kunkel, R., Beauchamp, C. Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J Clin Invest* 72:789-801;1983.
53. Thompson, AB., Bohling, T., Payvandi, F., Rennard, SI. Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. *J Lab Clin Med* 115:148-158;1990.
54. Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, RB., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I.,

- Sussman, JL., Tawfik, DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11:412-9; 2004.
- 55.** Padayatty, SJ., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee J-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S., and Levine, M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll of Nutrition* 22:18-35;2003.
- 56.** Bielski, BHJ., Richter, HW. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann NY Acad Sci* 258:231-237;1975.
- 57.** Evans, H.M., and Bishop, K.S. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56:650-651;1922.
- 58.** Brigelius-Flohé, R, and Traber, MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13:1145-1155;1999.
- 59.** Witting, LA. Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions. In: Pryor A, ed. *Free radicals in biology IV*. New York: Academic Press. pp 295-319;1980.
- 60.** Wefers, H., Sies, H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174:353-357;1988.
- 61.** Van Der Vliet, A., O'Neill, CA., Cross, CE., Koostra, JM., Volz, WG., Halliwell, B., Louie, S. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol* 20:L289-L296;1999.
- 62.** Clinton, SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 56:35–51;1998.
- 63.** Goulinet, S., Chapman, MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogeneous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 17:786–96;1997.
- 64.** Arab, L., Steck-Scott, S. and Fleishauer, AT. Lycopene and the Lung. *Experimental Biology and Medicine* 227:894-899;2002.
- 65.** Martin LJ. DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67:377-87;2008.

66. National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert Panel Report 2. Pub 97-4051, Bethesda, MD:NIH,1997.
67. Dworski, R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 55:S51-S53;2000.
68. Dubowsky, SD., Suh, H., Schwartz, J., Coull, BA., and Gold, DR. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environ Health Perspect* 114:992-998;2006.
69. Henricks, PA., Nijkamp, FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14:409-420;2001.
70. De Raeve, HR., Thunnissen, FBJM. Kaneko, FT., Guo, FH., Lewis, M., Kavuru, MS., Secic, M., Thomassen, MJ., and Erzurum, SC. Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airways epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am J Physiol* 272:L148-L154;1997.
71. Green, RH., Brightling, CE., Woltmann, G., Parker, D., Wardlaw, AJ., Pavord, ED. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 57:875-879;2002.
72. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ: Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1532-1539;1999.
73. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW: Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1001-1008;1999.
74. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N: Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: Evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119:1329-1336;2001.
75. Sur, S., Crotty, TB., Kephart, GM., Hyma, BA., Colby, TV., Reed, CE., Hunt, LW., Gleich, GJ: Sudden-onset fatal asthma: A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Resp Dis* 148:713-719;1993.

76. Tonnel, AB., Gosset, P., Tillie-Leblond, I: Characteristics of the Inflammatory response in bronchial lavage fluids from patients with status asthmaticus. *Int Arch Allergy Immunol* 124:267-271;2001.
77. Carroll, NG., Mutavdzic, S., James, AL: Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57:677-682;2002.
78. Bhupinder, SM., and Chung, KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Research* 7:59-69;2006.
79. Halliwell, B., Whiteman, M. Measuring reactive oxygen species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J. Pharm.* 142:231-255;2004.
80. Torres Ramos Yessica Dorin, Sierra Vargas Martha Patricia, Olivares Corichi Ivonne María, Hicks Gómez Juan José. *Rev Inst Nal Enf Respir.*19:206-213;2006.
81. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report: guidelines for the diagnosis and management of asthma: update on selected topics-2002. Bethesda, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH publication no. 02-5074;2003.
82. Bøyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest* 97:7-10;1968.
83. Ferrante, A., Thong, YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods.* 36:109-17;1980.
84. Trush, M.A., Wilson, M.E. and Van Dyke, K. The Generation of Chemiluminescence (CL) by Phagocytic Cells. *Methods Enzymol.* 57:462-494;1978.
85. Abbott, CA., Mackness, MI., Kumar, AS., Boulton, AJ., Durrington, PN: Serum paraoxonase activity, concentration and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1812-1818;1995.

86. Bozeman, PM., Learn, DB., Thomas, EL. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *J Immunol Methods* 126:125-133; 1990.
87. Yagi, K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108:107-110; 1998.
88. Comhair, SAA., and Erzurum, SC. Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L246-L255; 2002.
89. Caramori, G., Papi, A. Oxidants and Asthma. *Thorax* 59:170-173; 2004.
90. Nadeem, A., Chambray, SK., Masood, A., Raj, HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111:72-78; 2003.
91. Alexis, NE., Lay, JC., Zeman, KL., Geiser, M., Kapp, N. and Bennett, WD. In vivo particle uptake by airway macrophages in healthy volunteers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:305-313; 2006.
92. Huang, NH., Wang, Q., Xu, DQ. Immunological effect of PM_{2.5} on cytokine production in female Wistar rats. *Biomed Environ Sci* 21:63-8; 2008.
93. Watterson, TL., Sorensen, J., Martin, R., Coulombe, RA Jr. Effects of PM_{2.5} collected from Cache Valley Utah on genes associated with the inflammatory response in human lung cells. *J Toxicol Environ Health A* 70:1731-44; 2007.
94. Lunborg, M., Johard, U., Lastbom, L., Gerde, P., Camner, P. Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environ Res* 86:244-253; 2001.
95. Brown, DM., Donaldson, K., and Stone, V. Effects of PM₁₀ in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir Research* 5:29-40; 2004.
96. Carter, JD., Ghio, AJ., Samet, JM., Devlin, RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metaldependent. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:180-188; 1997.
97. Valko, M., Morris, H., and Cronin, MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Med Chem* 12:1161-1208; 2005.

98. Osornio-Vargas, AR., Bonner, JC., Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Ponce-de-León Rosales, S., Miranda, J., Rosas, I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 111:1289-1293;2003.
99. Brown, DM., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W., Donaldson, K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* 57:685-691;2000.
100. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR: Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352:342-344;1991.
101. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem.* 275:37524–37532;2000.
102. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77:598-625;2005.
103. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99:2075-2081;1997.
104. Shao B, Bergt C, Fu X, Green P, Voss JC, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *J Biol Chem.* 280:5983-93;2005.
105. Ekmekci OB, Donma O, Ekmekci H, Yildirim N, Uysal O, Sardogan E, Demirel H, Demir T: Plasma paraoxonase activities, lipoprotein oxidation, and trace element interaction in asthmatic patients. *Biol Trace Elem Res* 11:41-52;2006.
106. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108:1440-1445;2003.
107. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:473-80;2001.

-
- 108.** Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 15:261-267;2004.
- 109.** Künzli N, Tager IB Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly* 35:697-702;2005.
- 110.** Olivares-Corichi I, Ceballos G, Ortega Camarillo C, Guzmán Grenfell AM, and Hicks JJ. Reactive Oxygen Species (ROS) induce chemical and structural changes on human insulin in vitro, including alterations in its immunoreactivity. *Frontiers in Bioscience* 10:838-843;2005a.
- 111.** Olivares-Corichi IM, Ceballos G, Medina-Santillán R, Medina-Navarro R, and Hicks JJ. Oxidative changes on human insulin induced by ROS “in vitro” decreases its biological activity upon adipose tissue glucose- C14 utilization. *Frontiers in Bioscience* 10:3127-3131;2005b.
- 112.** Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TD, Koo JC, Witztum JL. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 320:915-924;1989.