



00361
21
Ti

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CONCENTRACION DE LIPOPEROXIDOS Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUERO
SANGUINEO HUMANO.
EFECTO DE LA CONTAMINACION ATMOSFERICA
Y EL TABAQUISMO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

BIOL. RAFAEL MEDINA NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR JUAN JOSE HICKS GOMEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN BIOQUIMICA
DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, BAJO LA
DIRECCION DEL DOCTOR JUAN JOSE HICKS Y FORMO PARTE DE UN PROYECTO DE
INVESTIGACION FINANCIADO PARCIALMENTE POR CONACYT: REF. F537-M9308**

DEDICO ESTE TRABAJO A MI ESPOSA PATRICIA Y A MIS HIJAS

ARANTXA Y DENISSE

**A ROSA MARIA
ALEJANDRO
Y ALE**

CON UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO PARA UNO DE LOS CIENTIFICOS

MAS IMPORTANTES DE NUESTRO PAIS:

EL DOCTOR JUAN JOSE HICKS GOMEZ

GRACIAS POR TODO MAESTRO.

GRACIAS:

A CECILIA VILAR, MARGARITA DIAZ, GENOVEVA DURAN, ALFONSO VELAZQUEZ Y JOSE LUIS SAUER
POR SU COLABORACION EN LA TOMA DE MUESTRAS.

AL DOCTOR JEFFERSON PROAÑO POR SU APOYO EN EL ANALISIS DE LOS DATOS.

AL DOCTOR JESUS REYNAGA OBREGON POR SUS OPINIONES SOBRE EL ANALISIS ESTADISTICO.

A LA SEÑORA ROSITA BELLO POR LAS CORRECCIONES AL TEXTO, EL ENTUSIASMO Y EL ESTIMULO
COTIDIANO.

A TODOS MIS COMPAÑEROS: MARGARITA, CECILIA, GENOVEVA, CLARITA, CONSUELO, JOSE LUIS,
JESUS, ALBERTO, GRACIELA, ALFONSO, ROSITA, OSWALDO, FELIPE, GISELA, MARCELA...POR LA
AMISTAD QUE TANTO APRECIO.

A LOS MIEMBROS DE MI JURADO: DRA. MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ, DRA. LUISA A. ALBA
LOIS, DR. JESUS AGUIRRE LINARES, DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ, DR. WILHELM HANSBERG TORRES,
DRA. ALEJANDRA MAINERO DEL PASO, M.C. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA; POR COMPARTIR
DESINTERESADAMENTE SU TIEMPO Y LOS CONOCIMIENTOS QUE CONFORMARON FINALMENTE AL
PRESENTE TRABAJO.

INDICE

	pags.
I. INTRODUCCION.....	2
1. La Ciudad de México y la contaminación del aire.....	2
2. Los contaminantes atmosféricos y su efecto en la salud. El daño por ozono.....	8
3. La formación de los contaminantes atmosféricos. Mecanismo fotoquímico de la formación y la concentración de oxidantes.....	12
4. Ozono, radicales libres y peroxidación.....	16
5. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	18
6. Peroxidación de lípidos.....	28
7. Tabaquismo y daño por peroxidación.....	31
8. Mecanismo fisiológico de protección antioxidante.....	33
II. DEFINICION DE LA HIPOTESIS DE TRABAJO.....	40
III. OBJETIVOS.....	42
IV. MATERIAL Y METODO.....	43
1. Reactivos y equipo.....	43
2. Obtención y procesamiento de las muestras.....	43
3. Productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (ATB).....	48
4. Dienes conjugados.....	52
5. Cromolípidos.....	54
6. Superóxido dismutasa (SOD).....	57
7. Proteínas.....	60
8. Capacidad Antioxidante del Suero (CAS).....	60
V. RESULTADOS.....	66
1. Tablas de resultados individuales para cada variable.....	67
2. Datos generales de los grupos para cada variable.....	69
3. Resumen de los resultados del análisis estadístico.....	71
VI. DISCUSION.....	73
VII. CONCLUSIONES.....	79
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	80

I. INTRODUCCION.

1. La Ciudad de México y la contaminación del aire.

Generalidades.

A 2240 metros sobre el nivel del mar, la Ciudad de México se asienta sobre un valle rodeado de montañas cuya distribución limita la libre circulación de los vientos y modula el patrón regular de su flujo dominante (noreste-suroeste), determinando la conformación de una cuenca cerrada donde se acumulan los contaminantes atmosféricos generados por alrededor de 3 millones de vehículos que circulan a diario por la ciudad y por una actividad industrial que involucra a un tercio de las industrias de todo el país (en una superficie equivalente al 0.76% del total). La contaminación atmosférica alcanzó las 16 toneladas de contaminantes en un cálculo realizado en 1980, 65% proveniente de emisiones vehiculares y 35% de las industrias (Acuña, 1987). Dadas estas condiciones, la Ciudad de México ha sido considerada la más contaminada del país y quizás de todo el mundo (Anders, 1988; Torres, 1979);

Por su origen, los contaminantes atmosféricos pueden clasificarse en primarios, aquellos emitidos por una fuente de manera directa, y secundarios, aquellos formados a partir de reacciones químicas (Suárez, 1991). Los principales contaminantes derivados de la combustión de los hidrocarburos y otros materiales combustibles son: dióxido de azufre (SO_2), derivado principalmente de la actividad industrial (97%) y de la emisión por automotores diesel (3%); dióxido de nitrógeno (NO_2) y monóxido de carbono (CO), derivados de la combustión de automotores (62% de NO_2 y 98% de CO), y de la industria (38% de NO_2 y 2.0 % de CO); Hidrocarburos (HC), derivados principalmente de la actividad vehicular (69%) e industrial (31%), partículas suspendidas, producto de tolvaneras y otros fenómenos mecánicos, de combustión y otros. El Ozono (O_3), es un contaminante secundario formado a partir de dióxido de nitrógeno hidrocarburos y radiación solar. Otros contaminantes, intermediarios y productos secundarios

derivados de reacciones también deben tomarse en cuenta, como son: ácido sulfúrico, amoníaco, mercaptanos, metales pesados, aldehidos y otros, algunos de los cuales serán analizados más adelante.

Del total de la contaminación atmosférica registrada en la Ciudad de México, la derivada de reacciones fotoquímicas posee especial trascendencia, tanto por su capacidad para generar peligrosos oxidantes, como por ser la que aparentemente prevalece y se ha incrementado en los últimos años. Esta contaminación fotoquímica o "smog fotoquímico" es producto de la acción de la luz del sol sobre los componentes hidrocarbonados y óxidos de nitrógeno procedentes de la combustión ocurrida en los vehículos automotores, y su consecuencia, una mezcla compleja de varios compuestos, entre otros: ozono (O_3), dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrato de peroxiacetilo (PAN), aldehidos derivados de hidrocarburos (RCHO), peroxirradicales derivados (RO_2^{\cdot}) y otros radicales. La contaminación fotoquímica tiene pues como característica importante, que los productos derivados de ésta (contaminantes secundarios), son formados en el aire a partir de la acción directa de la radiación y una serie consecutiva de reacciones.

El origen del problema.

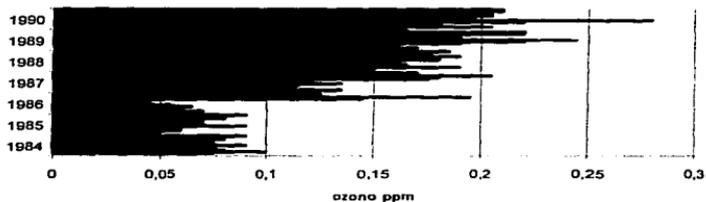
La contaminación por ozono no constituyó un problema importante hasta mediados de los años ochenta. En aquel tiempo, Bravo y colaboradores, investigadores del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, llamaron la atención sobre el repentino aumento en las concentraciones de ozono, coincidentes con el cambio de gasolinas realizado por PEMEX en el segundo semestre de 1986 (Bravo et al, 1987). La razón técnica del cambio en la formulación obedeció a que la gasolina anterior a 1986, estaba constituida por gasolinas primarias con alto porcentaje de parafinas de bajo octano y que obligaban a adicionar tetraetilo de plomo para elevar su octanaje (Bravo et al, 1992). Como consecuencia, las concentraciones de plomo se mantuvieron por encima de las normas durante muchos años.

Para el mes de agosto de 1986, cumpliendo con un decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación, la Secretaría de Energía Minas e Industria Paraestatal a través de PEMEX había implementado las acciones conducentes a abastecer gasolinas con bajo contenido de plomo e incluir aditivos en ellas (Bravo, Sosa y Torres, 1991). A partir de entonces, PEMEX ha logrado reducir gradualmente la cantidad de plomo en las gasolinas que se consumen en la Ciudad de México, lo que se ha venido a reflejar en concentraciones atmosféricas de este metal por debajo de la norma recomendada de calidad del aire ($0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Sin embargo, la gasolina introducida a mediados de 1986, de alto octano y concentraciones mínimas de tetraetilo de plomo, no vino acompañada de un cambio en los motores de la flota vehicular, con un diseño capaz de la utilización de convertidores catalíticos. Esto provocó a partir de entonces un drástico incremento en la generación de precursores de la contaminación fotoquímica y por tanto de la formación de ozono, esto es, hidrocarburos reactivos y óxidos de nitrógeno, los cuales en otra circunstancia debieran ser eliminados (transformados) por los convertidores catalíticos. En la gráfica 1.1 se presenta el promedio de las concentraciones mensuales de ozono, que fueron registrados en la Ciudad Universitaria por Bravo y su grupo de trabajo de 1984 a 1990. Es importante notar el cambio que se presenta a partir de la segunda mitad de 1986.

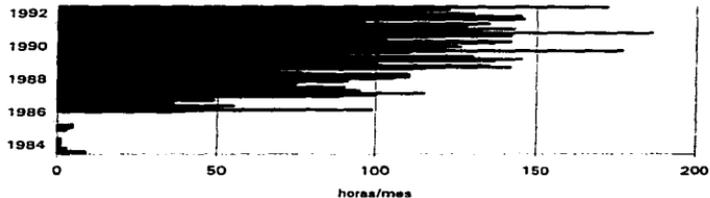
Otro aspecto que destaca de la gráfica 1.1 es el que se refiere a las concentraciones de ozono. La importancia de la contaminación fotoquímica en la zona metropolitana de la Ciudad de México se hace evidente al conocer que la norma mexicana de calidad del aire señala para el ozono 0.11 ppm como promedio máximo en una hora una vez al año (0.12 ppm para Estados Unidos ; 0.06 ppm para Japón), cifra que ha sido rebasada por mucho a partir de la segunda mitad del año de 86, esto es luego del cambio de las gasolinas. En la gráfica 1.2 se muestra el número de violaciones mensuales a la norma de calidad del aire, que fueron registradas por Bravo y su grupo del Centro de Ciencias de la Atmósfera (UNAM) para el período 1984-1992.

Promedio de las concentraciones mensuales de ozono 1984-1990. Estación del Centro de Ciencias de la Atmósfera (U.N.A.M.)



Gráfica I.1

Violaciones mensuales a la norma de calidad del aire 1984-1992. Estación del Centro de Ciencias de la Atmósfera (U.N.A.M.)



Gráfica I.2

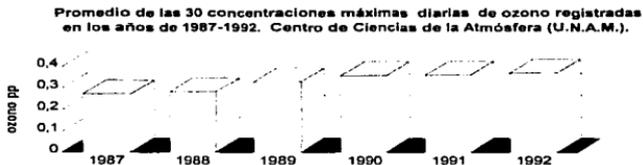
El cambio de gasolineras como factor determinante en el origen y la prevalencia de la contaminación fotoquímica se sumó a las características climáticas y geográficas preexistentes en el valle de México. Sin embargo, son también factores importantes otras medidas equivocadas que se tomaron por parte de las autoridades gubernamentales ocupadas del problema, como lo fue la imposición del programa "Hoy no circula" para retirar de la circulación 500 mil vehículos por día y que trajo como consecuencia, más tarde, un aumento en el número de altas en el registro de placa permanente y ventas en el D.F. (Bravo, 1992); la contaminación del aire ha persistido y aún aumentado considerablemente.

En cuanto a las expectativas, a pesar de que las autoridades insisten en señalar que las medidas adoptadas en el control de la contaminación atmosférica en la Ciudad de México han sido las adecuadas, no existe evidencia que permita vislumbrar una posible solución al problema. En este sentido, como respuesta a una pretendida mejora de las condiciones de la contaminación por ozono para el año de 1992, en que se tuvieron un número menor de excedencias a la norma de calidad del aire, Bravo ha destacado la posibilidad de que la causa sea una anomalía climatológica que derivó en un exceso de precipitación pluvial para dicho período (Bravo et.al, 1993). En la misma dirección, se establece que la estimación de la calidad del aire puede ser alterada por factores climáticos, que obligan a adoptar nuevos criterios de valoración. Así, la Air Resource Board de California recomienda como un indicador de la tendencia en la concentración de ozono, tomar el promedio de los 30 valores máximos reportados al día, esto es el denominado "30 mean average method". Al utilizar dicho criterio, es posible determinar de forma más objetiva la tendencia de la contaminación a través de los años. En la figura 1.3 aparece la tendencia para el período 1987-1992.

Las consecuencias de la exposición a estas altas concentraciones de contaminantes atmosféricos en la zona metropolitana de la Ciudad de México se desconocen, al igual que se

desconoce si algunas de las anomalías en la recurrencia de enfermedades respiratorias reportadas en las instituciones de salud en el país están directamente relacionadas con la contaminación del aire. Así, aunque se desconoce la causa del incremento de la morbilidad por asma, reportado en la literatura médica de los últimos años, se sospecha de contaminantes ambientales como factor etiológico primordial (Whittemore and Korn, 1980).

Por otro lado, en numerosas publicaciones se han puntualizado las alteraciones fisiológicas y bioquímicas relacionadas con la exposición a contaminantes específicos como el ozono. Algunas de éstas serán examinadas en la siguiente sección.



Gráfica 1.3

Bravo H.A., Sosa R.E., Roy-Ocotla G.R., Sánchez P.A. Presentation at the 86th Annual Meeting Exhibition, Denver, Colorado, June 13-18, 1993.

2. Los contaminantes atmosféricos y su efecto en la salud. El daño por ozono.

El efecto nocivo de la contaminación atmosférica sobre la salud, es en realidad la suma de los efectos individuales de cada uno de los contaminantes que la conforman. De estos, 6 se cuentan para constituir cerca del 100% de la contaminación atmosférica: monóxido de carbono, bióxido de azufre, hidrocarburos reactivos, partículas suspendidas, óxidos de nitrógeno y oxidantes fotoquímicos (Amdur, 1985). Una categorización general de acuerdo a su naturaleza química y que permite aproximarse a su modo de acción, discrimina entre contaminantes reductores (Bióxidos de azufre, monóxido de carbono, productos de la contaminación incompleta del carbón) y contaminantes oxidantes (hidrocarburos, óxidos de nitrógeno, oxidantes fotoquímicos). Los efectos agudos sobre la salud son asociados generalmente con la contaminación reductora, dado que ésta fué la causa de algunos de los episodios en los que se ha originado mayor mortandad (Meuse Valley Bélgica, 1930 (65 muertes); Donora Pennsylvania, USA, 1948 (20 muertes); Londres Inglaterra, 1952 (4000 muertes). Por otro lado, se ha podido identificar una correlación significativa entre los altos niveles de oxidantes en el aire y un aumento en la frecuencia de admisiones hospitalarias por desórdenes de tipo alérgico (asma), infeccioso (influenza, bronquitis), etc., lo que no parece extraño dadas las tendencias actuales en el uso de combustibles y la prevalencia de contaminantes de tipo oxidante. Sin embargo, las verdaderas consecuencias, a mediano y largo plazo, de la contaminación por esta clase de moléculas se desconocen.

Independientemente de la posible participación directa de las especies reactivas del oxígeno generados durante los eventos de la contaminación fotoquímica (y que han sido poco estudiados), se han podido llevar a cabo investigaciones en relación con el daño producido por ozono, actualmente el principal oxidante presente en la atmósfera de una ciudad con problemas

de contaminación. La mayoría de estos estudios se han efectuado dentro de cámaras especiales y en condiciones controladas, generalmente en adultos, y utilizando concentraciones que varían en un rango más o menos estrecho. Bajo estas condiciones se han encontrado cambios en la función pulmonar, que incluyen una caída en el volumen expiratorio forzado (FEV1) y la capacidad vital (FVC), un incremento en la resistencia específica de las vías aéreas y en la frecuencia respiratoria y una baja en el volumen tidal (Horstman et al., 1990). También ha sido posible identificar incrementos en la permeabilidad pulmonar (Kerf et al., 1987) a agentes como la histamina y la metacolina (Holzmann et al., 1979). Así mismo, el ozono está relacionado con la enfermedad pulmonar obstructiva (Menzel, 1992) y genera hiperreactividad bronquial asociada posiblemente con el flujo de neutrófilos, a dosis iguales a las encontradas cualquier día en la Ciudad de México (Murlas, 1985). Un resumen de algunas de las alteraciones provocadas por la exposición a ozono en el ser humano aparecen en la tabla 1

La mayoría de estos trabajos están dirigidos de forma general a los cambios relacionados con la función respiratoria y se basan en pruebas que valoran la fisiología pulmonar, así como en algunos cambios citológicos y bioquímicos a nivel de fluidos alveolares. Por otro lado, los trabajos llevados a cabo en animales permiten profundizar en algunos aspectos en los que la misma experiencia es difícil de reproducir en seres humanos. En la Tabla 2 aparecen algunos de los efectos y consecuencias de la exposición al ozono en la rata. En este sentido, destacan aquellos cambios notables en algunas enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa citosólica y mitocondrial, al igual que aquellos cambios en glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como marcadora del envejecimiento, etc., pero sobre todo, el posible efecto peroxidativo sobre el pulmón, y que se ha asociado a la etiología de diversas enfermedades y al fenómeno del envejecimiento celular.

Tabla 1

ALGUNOS EFECTOS REPORTADOS DESPUES DE LA EXPOSICION A OZONO EN EL SER HUMANO.

CONCENTRACION p.p.m.	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
0.08 0.10 0.12	6 h	↓ FUNCION PULMONAR (Δ FEV1) SINTOMAS RESPIRATORIOS DE MODERADOS A SEVEROS ↑ REACTIVIDAD PULMONAR.	<i>Horstman D.H., et al, 1990</i>
0.10 0.12	6 h 1 h	BRONCOCONSTRICION, CAMBIOS BIOQUIMICOS Y CELULARES EN FLUIDOS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR ↑ RESPUESTA BRONQUIAL A ALERGENOS. (HISTAMINA, METACOLINA). ↓ FUNCION PULMONAR (Δ F.E.V 1)	<i>Devlin R.B., McDonnell W.F., Mann R et al, 1991</i> <i>Mollino N.A., 1991</i>
0.4	2 h	↓ FUNCION PULMONAR (FVC)	<i>Kehrl. H R et al. 1987</i>
0.6	2 h	↑ HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL (HISTAMINA, METACOLINA)	<i>Holtzman, 1979</i>
1.0	24 h	OBSTRUCCION PULMONAR, INTOLERANCIA, ENVEJECIMIENTO Y DAÑO PULMONAR ↑ ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.	<i>Kreul J.W., Gross K.B., Moore T.B et al, 1989</i>

FEV1 = FORCED EXPIRATORY VOLUME ; FVC= FORCED VITAL CAPACITY ;

En efecto, la reacción del ozono con las dobles ligaduras carbono-carbono de los ácidos grasos se conoce desde hace varios años (Golstein and Balchum, 1967; Thomas, Muller and Lyman, 1968; Rohem, Hadley and Menzel, 1971). En estudios previos, se ha encontrado evidencia de una peroxidación lipídica en los eritrocitos expuestos al ozono *in vitro*, al igual que en el pulmón de ratas expuestos a 0.7 ppm de ozono *in vivo* (Goldstein, 1970). Con la aplicación de técnicas de ESR y atrapamiento del spin se ha podido detectar la generación de radicales *in vivo* durante la inhalación de ozono en ratas (Kenedy et al., 1992).

Tabla 2
ALGUNOS EFECTOS DE LA EXPOSICION A OZONO EN RATA

CONCENTRACION p.p.m.	TIEMPO	EFEECTO	TEJIDO	REFERENCIA
0.4	8 h	↓ ACTIVIDAD DE G.P. G.R., G-6-FD Y NIVELES DE G-SH	PULMON	<i>Chow, 1976</i>
0.7	3-6 h	LIPOPEROXIDACION	PULMON ERITROCITO	<i>Goldstein y Balchum, 1967</i>
0.7	5 dias	↑ ACTIVIDAD DE SOD (Cu, Zn, Mn), CATALASA Y G.P.	PULMON	<i>Rahman, Clerch y Massaro, 1991</i>
0.7- 0.8	5-7 dias	↑ REACTIVOS AL ATB (LIPOPEROXIDACION) ↑ ACTIVIDAD DE G.P., G.R Y G-6-FD	PULMON	<i>Chow y Tappel, 1977</i>
1.0	24 h min 72 h max	TRANSFORMACION EPITELIAL	PULMON	<i>Chow, 1976</i>
10.4	6 h	EDEMA PULMONAR Y MUERTE.	PULMON	<i>Goldstein, 1970</i>

G.P., GLUTATION PEROXIDASA. G.R., GLUTATION REDUCTASA. G-SH., GLUTATION REDUCIDO. G-6-FD, GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA. SOD., SUPEROXIDO DISMUTASA. ATB, ACIDO TIOBARBITURICO.

Es de interés el destacar, que una experiencia similar a la de la peroxidación lipídica en el pulmón de rata se ha encontrado para el bióxido de nitrógeno, a concentraciones similares a las encontradas en la atmósfera de una ciudad contaminada (Thomas et al., 1968). Se ha sugerido así mismo, que la peroxidación de lípidos podría ser el mecanismo central del proceso de envejecimiento (Barber and Bernheim, 1967; Jain and Hochtein, 1980). Animales expuestos crónicamente al ozono, mostraron claros signos de envejecimiento prematuro (Freeman and Crapo, 1982).

3. La formación de los contaminantes atmosféricos. El mecanismo fotoquímico de la formación y concentración de los oxidantes.

La combustión que se produce en el interior de los motores que mueven vehículos y maquinaria de la más diversa naturaleza en la industria, genera múltiples productos de desecho como resultado de la descomposición de las moléculas que constituyen los combustibles fósiles. Entre estas moléculas, a las que se les ha llamado también precursores antropogénicos, destacan por su importancia en el complejo fenómeno de la contaminación fotoquímica y por su concentración, los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos secundarios. El bióxido de nitrógeno (NO_2) es una molécula capaz de absorber energía de casi la totalidad del espectro electromagnético. Sin embargo, con gran eficiencia absorbe energía a longitudes de onda del ultravioleta, de entre 200 y 400 nm. A raíz de esto, la molécula de NO_2 se rompe (fotólisis), determinando el principio básico de la formación fotoquímica del ozono y de otros oxidantes. Esta reacción de disociación requiere una energía suficiente para romper los enlaces entre NO y NO_2 (72 kilocalorías/g-mol a 25° C) y ocurre con rapidez (2 min la vida media del NO_2 en el aire para un día normal) (Stephens, 1969b). Esta reacción da inicio al llamado ciclo fotocíclico del bióxido de nitrógeno, molécula que, al disociarse, forma NO y oxígeno atómico (O); el cual al combinarse con el oxígeno molecular (O_2), genera el ozono (O_3). El ozono a su vez es capaz de reaccionar con el NO, cerrando el ciclo al generar de nuevo NO_2 (Figura 1.1).

De acuerdo a este ciclo, las concentraciones del O_3 y del NO deberían de permanecer constantes; sin embargo no sucede así. En efecto, si en una cámara de reacción se mezclan NO, NO_2 , aire y a continuación se iluminan con luz ultravioleta, rápidamente es posible detectar O_3 en el interior de la cámara, que establece una reacción de equilibrio con el NO_2 , es decir, se produce tanto ozono como bióxido de nitrógeno se disocia. Si, por otro lado, se irradian las emisiones del escape de un automóvil en las mismas condiciones, entonces se generan rápidamente concentraciones mucho más altas de NO_2 y de ozono, mientras que aparecen otros

compuestos como el nitrato de peroxiacetilo (PAN) y aldehídos, en tanto el NO tiende a desaparecer.

La causa de esta perturbación en el ciclo fotolítico del NO_2 que de hecho se presenta en la atmósfera de una ciudad contaminada, se explica si se toma en cuenta la intervención en la atmósfera de radicales libres altamente reactivos. Estos radicales, formados a partir de reacciones en las que también interviene la energía de la luz ultravioleta, interaccionan con los hidrocarburos y el CO_2 , presentes normalmente en la atmósfera, derivando en la generación de otros nuevos radicales orgánicos e inorgánicos, capaces de oxidar el NO hasta NO_2 y perturbando el ciclo normal, lo que lo desplaza hacia la generación de NO_2 y por tanto de ozono. En la figura 1.1 se presenta el ciclo fotolítico del NO_2 y el proceso que conduce a su alteración.

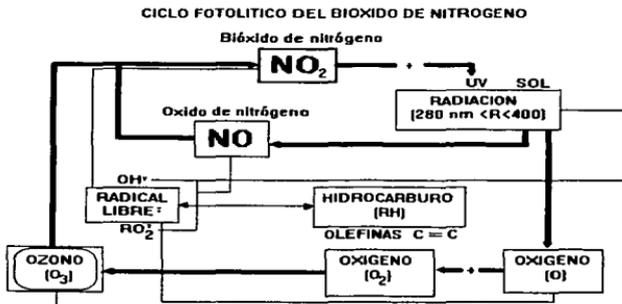
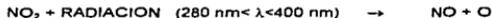


Figura 1.1

A continuación se describen las reacciones químicas del ciclo fotocíclico del NO_2 , su perturbación y el mecanismo de la formación de radicales orgánicos.

Mecanismo fotoquímico de la formación del ozono.

1- La fotólisis del NO_2 y el sistema de reacciones fotoquímicas acopladas: óxido de nitrógeno (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2) y ozono (O_3).



2- Perturbación del sistema por la intervención de radicales libres.

a) Los radicales hidroxilo reaccionan con el CO para formar radicales peroxilo (HO_2^*):



b) Los radicales hidroxilo reaccionan con hidrocarburos para formar radicales peroxilo (RO_2^*):



c) Los radicales peroxilo así formados oxidan el NO a NO_2 :

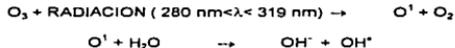


c) Como resultado de la oxidación del NO, el ciclo se desplaza hacia la formación del

NO₂, y por tanto a la formación y acumulación del O₃.

3- Origen fotoquímico de la formación de radicales.

a) Fotólisis del O₃ y formación del radical hidroxilo (OH*):



b) Los radicales peroxilo inorgánicos y orgánicos (HO₂* y RO₂*) se forman a partir de la interacción del radical hidroxilo con hidrocarburos y CO, como se muestra en 2 a) y 2 b).

4- Interacción radical libre-hidrocarburo.

a) Formación de un radical orgánico a partir del ataque a una doble ligadura de un hidrocarburo insaturado:



b) Reacción del radical orgánico del hidrocarburo con el O₂ y formación del radical peroxilo (ROO*):



* molécula intermediaria necesaria para absorber la energía de la reacción. En el aire ésta molécula podría ser el N₂ o bien el mismo O₂, dado que se encuentran entre las más disponibles.

4. Ozono, radicales libres y peroxidación.

Se ha postulado que el ozono, debido a su gran reactividad, tiene la capacidad de oxidar moléculas directamente, o bien, generar radicales libres capaces de extraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos insaturados y formar peróxidos lipídicos (Mustafa,1990). La reacción del ozono con las dobles ligaduras de las uniones carbono-carbono se ha reportado desde hace 25 años (Goldstein, 1970). Se ha reportado que el ozono puede reaccionar a pH alcalino en soluciones acuosas para formar $\text{OH}\cdot$ (Halliwell and Cross, 1994). También se ha sugerido la posible formación de singlete de oxígeno al reaccionar el ozono con moléculas biológicas (*ibid supra*).

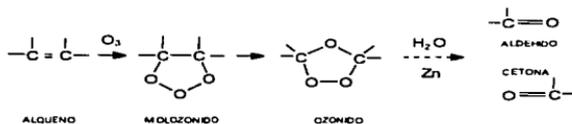


Figura 1.2a

La posibilidad de rompimiento de una doble ligadura entre los átomos de carbono se hace patente a través del análisis de una reacción clásica de los alquenos y otros hidrocarburos con el ozono, esto es, la ozonólisis o descomposición por ozono (Figura 1.2). En ésta, el ozono abre una doble ligadura convirtiendo el alqueno en productos de rompimiento como aldehídos y cetonas (Morrison and Boid,1978). Como se verá mas adelante los radicales libres actúan del mismo modo sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados desencadenando el proceso de peroxidación lipídica, al final del cual se generan igualmente productos secundarios entre ellos aldehídos y cetonas.

De hecho, al aislar e identificar a los productos de la reacción del ozono con los componentes del surfactante pulmonar, Lui y col. demostraron que los productos así formados eran los *cis* y *trans* ozonidos secundarios derivados de la fosfatidilcolina (Lui, Finlayson y Willis,

1990). Previamente, Roehm en 1972 habla reportado la formación de ozónidos a partir de metiloleato y metil-linoleato; posteriormente se sintetizaron y caracterizaron los ozónidos secundarios de esos mismos ésteres (Ewing, 1989). Recientemente Pryor identificó algunos ozonidos derivados de ácidos grasos insaturados pulmonares y de liposomas (Pryor y Church, 1991). En la figura 1.2b se presenta el posible mecanismo de acción del ozono sobre un ácido graso poli-insaturado.

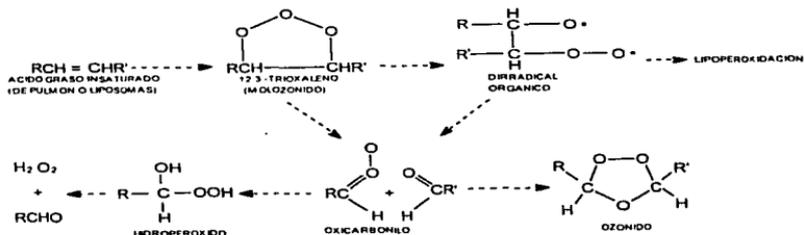


Figura 1.2b

En cuanto a la evidencia que apoya la posibilidad de que estén involucrados radicales libres en la toxicidad del ozono (Heath, 1976; Menzel, 1984), se han citado como productos de descomposición de este al radical hidroxilo (OH^\bullet), al superóxido (O_2^\bullet), así como al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Hoigne and Bader, 1975; Kenedy et al., 1992).

5. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Los orbitales atómicos son las regiones del espacio donde se encuentran los electrones de los átomos. En un átomo, cada orbital puede contener como máximo dos electrones, los cuales presentarán giros antiparalelos (de $+1/2$ y $-1/2$) en acuerdo con el principio de exclusión de Pauli. Tomando en cuenta lo anterior, un radical libre puede definirse como cualquier especie atómica o molecular que contiene uno o más electrones no apareados (Halliwell 1990). De acuerdo a esta definición, la molécula de oxígeno constituye un radical libre, del mismo modo que el átomo de hidrógeno y los metales de transición (estado iónico).

En realidad, la molécula de oxígeno presenta dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital π diferente, y constituye por lo tanto un birradical. Los dos electrones no apareados del oxígeno presentan giro (spin) paralelo, por lo cual las reacciones en las que intervenga deberán aportar, uno a uno, dos electrones con giro paralelo, para de esta forma ocupar los espacios vacantes en los orbitales π . Esto determina que se formen radicales libres de oxígeno de acuerdo al estado de oxidación de la molécula (Halliwell and Gutteridge, 1987).

Dioxígeno	O_2	$\bullet O-O\bullet$		
		$\downarrow e^-$ Primera reducción		
Radical anión superóxido	O_2^-	$O-O\bullet$		
		$\downarrow e^-$ Segunda reducción		
Ion peróxido	O_2^{2-}	$O-O$	$2H^+ \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
		$\downarrow e^-$ Tercera reducción + H^+		
1 Dianión	O^{2-}	O	$+ 2H^+ \rightarrow H_2O$	
2 Radical hidroxianión	O_1^-	$O\bullet$	$+ H^+ \rightarrow \bullet OH$	Radical hidroxilo.
		$\downarrow e^-$		
Dianión	O^{2-}	O	$+ 2H \rightarrow 2H_2O$	

Figura 1.3 \bullet electrón no apareado.

La mayoría de las moléculas biológicas se encuentran covalentemente ligadas y poseen electrones antiparalelos que ocupan el mismo orbital molecular, son por tanto estables y mucho menos reactivas que los radicales libres.

En cuanto a su origen, los radicales libres pueden formarse a partir de moléculas estables a través de procesos de fusión homolítica y reacciones de transferencia de electrones. Dichas reacciones se generan por a) absorción de energía de radiación: radiación ionizante, ultravioleta, visible y térmica, o bien b) por reacciones redox, como aquellas de transferencia de electrones no enzimática, reacciones catalizadas por metales de transición y reacciones catalizadas por enzimas (Slater, 1984). Las radiaciones ionizantes pueden generar una gran variedad de radicales libres al interactuar con la materia orgánica, entre ellos hidrógeno atómico H^{\bullet} , radical hidroxilo OH^{\bullet} y electrones e^{-} . Por otro lado la radiación ultravioleta de longitud de onda de alrededor de 300 nm posee la suficiente energía para generar homólisis del enlace C-C y generar así radicales libres. Además, radiación ultravioleta de energía relativamente baja puede generar radicales libres por la intervención de determinadas moléculas sensibilizantes (Pathak and Josh, 1984). La energía térmica puede también generar radicales libres, por ejemplo, al interactuar con determinadas moléculas, como es el caso del compuesto hidrosoluble clorhidrato de azobis (2-amidinopropano) que al descomponerse por calor genera radicales y N_2 (Wayner et al., 1985). Por otro lado, la materia orgánica al ser expuesta a altas temperaturas produce mezclas complejas de radicales. El contenido de radicales libres en el humo del cigarrillo es muy elevado (Pryor et al, 1983)

Otros radicales libres se forman a partir del catabolismo de diversos compuestos, como drogas y metabolitos, tal es el caso del radical triclorometilo CCl_3^{\bullet} , generado a partir del metabolismo del tetracloruro de carbono.

Como se mencionó con anterioridad, los radicales libres pueden formarse también a partir de reacciones de oxidorreducción. De hecho, el oxígeno utilizado por los organismos

superiores es reducido hasta agua a través del sistema de citocromo de la cadena respiratoria mitocondrial, y parte de este oxígeno escapa como anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$).

En la membrana de las células fagocíticas se localiza un complejo enzimático denominado sistema NADPH-oxidasas, que induce la catálisis de una serie de reacciones destinadas a la producción de las especies moleculares de oxígeno con poder germicida. Estas constituyen también reacciones de óxido-reducción en las que se generan radicales libres. Algunas de éstas se ilustran a continuación.



En el citoplasma del fagocito también existe superóxido dismutasa (SOD), por lo que se hace posible la reacción:



Debido a la presencia de mieloperoxidasa en el fagocito, se hacen posibles así mismo las siguientes reacciones:



...en donde la mieloperoxidasa utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno para transformar los halógenos en hipohalógenuros; éstos a su vez pueden formar singlete de oxígeno (1O_2).

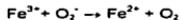
Varios metales de transición, como el hierro ($3+$ y $2+$) y el cobre ($+$ y $2+$) son capaces de cambiar sus estados de oxidación interviniendo en reacciones de transferencia electrónica univalente:



Se ha podido comprobar que los iones de Cu pueden promover reacciones de oxidación de grupos tiol:

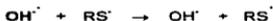


Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (puede ser el formado en las reacciones anteriores), en presencia de Fe^+ formará radical hidroxilo (OH^{\cdot}) vía la denominada reacción de Fenton, descrita por este autor en 1894 (Fenton H.J.H. J Chem Soc 1894. 65, 899-910. Cita tomada de Rice-Evans, 1994), al integrarse el llamado ciclo de Haber- Weiss:



La enorme reactividad de los radicales libres de oxígeno los llevan a interactuar ávidamente con otras moléculas. De los tipos de reacciones en las que participan algunas de gran importancia son las siguientes:

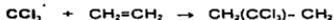
1.- Reacciones de transferencia de electrones:



2.- Reacciones de sustracción de átomos de hidrógeno:



3.- Reacciones de adición:



4.- Reacciones de anilación:



5.- Reacciones de desproporciónación:



Las afecciones relacionadas con el daño por radicales libres están estrechamente relacionadas con la naturaleza de las reacciones en las que intervienen y las moléculas con las que interactúan. Es esta la causa de que se encuentren involucrados en la etiología de numerosos padecimientos. A continuación se presentan algunas condiciones clínicas y padecimientos asociados posiblemente a radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Condiciones clínicas y padecimientos en los que se ha sugerido, podrían estar asociados radicales libres y especies reactivas de oxígeno. (tomado parcialmente de Halliwell and Gutteridge, 1990).

INFLAMACION, PADECIMIENTOS INMUNOLOGICOS.

- Glomerulonefritis (idiopática, membranosa)
- Vasculitis (Hepatitis B, drogas)
- Enfermedades autoinmunes.
- Artritis reumatoide

ESTADOS DE ISQUEMIA Y REPERFUSION.

- Embolia/infarto al miocardio/arritmias
- Rechazo a transplantes
- Inflamación de articulaciones
- Daño por congelación
- Contractura de Dupuytren
- Osteonecrosis isbárica

REACCIONES INDUCIDAS POR DROGAS Y TOXINAS

- Sobrecarga de hierro
 - Hemocromatosis idiopática
 - Sobrecarga dietaria de hierro (Bantu)
 - Talasemia y otras anemias crónicas
 - Deficiencias nutricionales (Kwashiorkor)
- Alcoholismo
 - Sobrecarga de hierro inducida por alcohol
 - Miopatía alcohólica

DAÑO POR RADIACION.

- Exposición nuclear y accidental
- Radioterapia
- Sensibilización celular a la hipoxia

ENVEJECIMIENTO.

- Desórdenes propios de envejecimiento prematuro.

CAMBIOS RELACIONADOS CON CELULAS ROJAS DE LA SANGRE.

- Intoxicación por plomo
- Fotooxidación de la protoporfirina
- Malaria
- Anemia de células fatisiformes
- Anemia de Fanconi
- Anemia hemolítica del prematuro.
- Metabolismo de la fenitidracina

Metabolismo de la primaquina y drogas relacionadas.

NEUMOLOGIA

Efectos del humo del cigarrillo

Enfisema pulmonar

Displasia broncopulmonar

Oxidaciones derivadas de contaminación (O3, NO2)

Algunas formas del síndrome de stress respiratorio (ARDS).

Pneumoconiosis por polvos minerales

Carcinogenicidad del asbesto

Toxicidad de la bleomicina

Toxicidad del SO₂

Toxicidad al Paraquat.

SISTEMA VASCULAR Y CORAZON

Cardiomiopatía alcohólica

Enfermedad de Keshan (deficiencia de selenio)

Arteriosclerosis

Cardiotoxicidad a la adriamicina

NEFROLOGIA

Síndrome nefrítico autoinmune

Nefrototoxicidad a aminoglicósidos

Nefrototoxicidad por metales pesados (Pb, Cd, Hg)

TRACTO GASTROINTESTINAL

Lesión endotóxica del hígado

Lesión hepática por hidrocarburos halogenados (vg. Bromobenceno, tetracloruro de carbono, halotano)

Acción diabetogénica de la aloxana

Pancreatitis

Lesiones gastrointestinales inducidas por drogas antiinflamatorias no esteroides (NSAID).

Envenenamiento por hierro

CEREBRO/SISTEMA NERVIOSO/DESORDENES NEUROMUSCULARES

Origeno hiperbárico

Deficiencia de vitamina E

Neurotoxinas inclusive plomo.

Enfermedad de Parkinson

Lesión cerebrovascular hipertensiva

Lipofuccinosis neuronal cerode

Encefalomiелitis alérgica y otras enfermedades desmielinizantes
 Sobrecarga de aluminio (Enfermedad de Alzheimer)
 Potenciación de daño traumático
 Distrofia muscular
 Esclerosis múltiple

OFTALMOLOGICOS

Cataratas
 Hemorragia ocular
 Daño degenerativo de la retina
 Fibroplasia retrolental (Retinopatía del prematuro)
 Retinopatía fútica

DERMATOLOGICOS

Lesiones por radiación solar
 Lesiones por calor
 Porfiria
 Fotosensibilización
 Dermatitis por contacto

Cuantificación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

La corta vida media de los radicales libres los hace particularmente difíciles de cuantificar. Aunado a esto, la posibilidad de su valoración se complica por la gran reactividad, que los hace interactuar avidamente con el material biológico y a una distancia muy corta del lugar en donde son generados. En la tabla 3 se presenta la vida media de algunos radicales libres (Sies, 1991).

Tabla 3. VIDA MEDIA DE RADICALES DE OXIGENO Y ESPECIES RELACIONADAS.

RADICAL	SUSTRATO	CONCENTRACION	VIDA MEDIA
HO [•]	LH	1M	10 ⁻⁹ seg.
RO [•]	LH	100 mM	10 ⁻⁸ seg.
ROO [•]	LH	1 mM	7 seg.
L [•]	O ₂	20μM	10 ⁻⁸ seg.
H ₂ O ₂			estable ; reducción enzimática.
O ₂ ^{-•}			dismutación espontánea y enzimática
1O ₂ ^{-•}	H ₂		10 ⁶
O ^{-•}			días
NO [•]			5.6 seg

La espectroscopía de resonancia electrónica del spin o ESR, así como su derivación de atrapamiento del spin (spin trapping) representa una técnica que ha sido utilizada para detectar y caracterizar radicales directamente, y se basa en la utilización del momento magnético generado por un electrón, en virtud de su paramagnetismo. Los electrones apareados en los átomos poseen sus cargas canceladas y por tanto carecen de momento magnético. Los electrones desapareados poseen momento magnético por la carga impuesta por el spin y son por tanto paramagnéticos. Estas especies paramagnéticas, en este caso radicales libres, cuando son expuestas a un campo magnético, orientan sus electrones desapareados de acuerdo a la dirección impuesta por el campo, (paralelo o antiparalelo). El aumento en la intensidad del campo magnético derivará en la orientación antiparalela de la mayoría de electrones al ser excitados. La resonancia resultante refleja la intensidad, que puede ser proporcional a la concentración de los radicales. En mezclas biológicas complejas el sistema pierde especificidad y generalmente se recurre al atrapamiento del spin o "spin trapping". El propósito de la técnica es la de añadir otro compuesto a la mezcla biológica, con la idea de generar especies más estables derivadas de radicales libres. Estas especies entonces serán más fácilmente detectables con ESR. Los compuestos usados o "traps" más comunes son nitronas y compuestos nitrosos (Benedetti, Bocci and Dianzani, 1981).

Otro procedimiento reciente para la detección y cuantificación de radicales libres lo constituye el análisis por luminiscencia (Boveris et al, 1980). Constituye la emisión de luz por un proceso no térmico. La luz es generada por una reacción química. La energía liberada por la reacción es absorbida por un sustrato que es excitado, estado en el cual los electrones periféricos son elevados a niveles energéticos superiores, cuando pierden energía retornan a su nivel energético basal, y la energía perdida en esta transición es liberada en forma de fotones. La longitud de onda de la luz emitida depende de varios factores: la molécula excitada, el pH del medio líquido, la presencia de iones metálicos y la cantidad de energía libre liberada en la reacción química. Así, la intensidad de luz emitida será proporcional a la concentración de los reactantes. Un esquema de la reacción general se presenta a continuación.



En la práctica solo algunos compuestos pueden ser cuantificados por la emisión directa de luz (luminiscencia). Tal es el caso del ATP, NADP(H) y el peróxido de hidrógeno. Es por ello que se suelen utilizar compuestos alternativos en reacciones acopladas (quimioluminiscencia). El luminol (5-amino-2,3-dihidro -1, 4-phtalazinediona) es un compuesto que emite luz cuando es oxidado por peróxidos o con radicales libres; de esta forma se transforma en alfa-aminofalato, nitrógeno y luz con una longitud de onda de 425 nm (Figura 1.4).

A pesar de ser de gran utilidad, por medio de quimioluminiscencia no es posible discriminar radicales entre si, ni radicales de peróxidos.

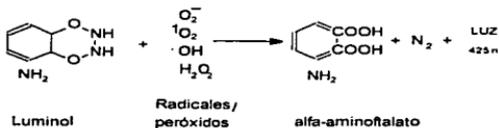


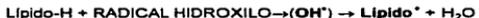
Figura 1.4

6. Peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos es un fenómeno complejo en el cual, una molécula hiperreactiva (vg. radical libre), ataca a un ácido graso no saturado, produce rearrreglos en su estructura molecular (dobles ligaduras), y desencadena una serie de reacciones que eventualmente pueden provocar la destrucción de membranas celulares (Wills and Wilkinson, 1966), y forman productos secundarios capaces de inactivar enzimas, reaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas y aún interactuar con el ADN (Roubal and Tappel, 1966; Reiss and Tappel, 1973; Mc Knight and Hunter, 1966; Wills; 1971; Freeman, 1982)

La lipoperoxidación se asocia a la etiología de enfermedades como son la arteroesclerosis (Grinna and Barber, 1972), la artritis reumatoide (Halliwell, 1982; Theofilopoulos and Dixon, 1982; Lunec and Dormandy, 1979), enfisema y cáncer (Reiss and Tappel, 1973; Brawn and Fridovich, 1981); Machlín and Bendich, 1987); Fridovich and Freeman, 1986). Así mismo, los productos de lipoperoxidación se asocian a la acumulación de pigmentos en ciertas células (lipofuccinosis) y el proceso de envejecimiento celular (Collip et al, 1967; Grinna and Barber, 1972; Koster and Slee, 1980; Jain and Hochstein, 1980); el daño que se produce por el proceso de isquemia-reperusión, luego de una intervención quirúrgica con derivación cardiopulmonar, se asocia también a la producción de radicales libres y lipoperoxidación. Muchas otras afecciones pueden estar asociadas a la producción de radicales libres de oxígeno teniendo como posible mecanismo de daño la peroxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos, etc. La lipoperoxidación se produce vía la intervención de radicales libres, en particular los del oxígeno y sus especies moleculares.

La lipoperoxidación principia con el ataque de una molécula reactiva (la cual se postula será un radical libre o alguna especie molecular relacionada) a las dobles ligaduras de ácidos grasos no saturados, con la consecuente sustracción de un átomo de hidrógeno:



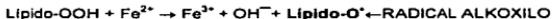
El átomo de hidrógeno tiene solo un electrón, por lo cual deja al átomo de carbono correspondiente con un electrón desapareado. El átomo de carbono vuelto un radical dentro del ácido graso tiende a estabilizarse por un rearrreglo molecular, para producir un **diene conjugado** (dobles ligaduras en arreglo secuencial), el cual tiende a reaccionar rápidamente con el O_2 para dar origen a un **radical peroxilo**:



Los radicales peroxilo pueden también extraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos y con esto provocar la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Al hacerlo, se forma a su vez un HIDROPEROXIDO.



Los hidroperóxidos lipídicos son moléculas relativamente estables, pero algunos compuestos de hierro reducido catalizan su descomposición, para dar origen a radicales alcoxilo (Lípido-O^\bullet):



También es posible la reacción de radicales peroxilo con compuestos de fierro

(III):



Los radicales alcoxilo y peroxilo estimulan la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica, al extraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos no saturados.

En la figura 1.5 se resumen algunos de los eventos de la lipoperoxidación lipídica.

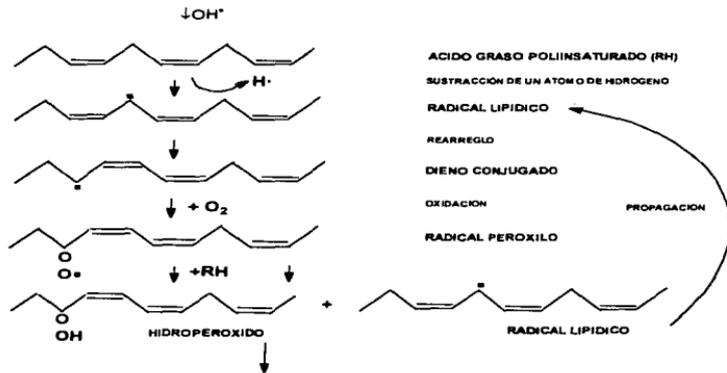


Figura 1.5. Cadena de eventos en la peroxidación lipídica. X^{*} representa un radical libre con la energía suficiente para extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado.

7. Tabaquismo, radicales libres y peroxidación.

Con anterioridad se señaló la posibilidad de la generación de radicales libres a partir de la absorción por ciertas moléculas de energía térmica. Efectivamente, ciertos materiales orgánicos al ser expuestos a altas temperaturas como en los casos en los que se quema la floresta y también en la combustión de los constituyentes del cigarrillo, produce mezclas complejas de radicales libres; el contenido de radicales libres en el humo del cigarrillo es muy alto (Slater, 1984)

Se mencionó con anterioridad que la activación de células fagocíticas como es el caso de neutrófilos, genera O_2^- , H_2O_2 , HOCl y otras especies reactivas derivadas de estos, con el propósito de lisar bacterias. Si una proporción muy elevada de fagocitos son activados en un área específica, estos podrán generar daño tisular. En el llamado síndrome de angustia respiratoria del adulto (ARDS= adult respiratory distress syndrome), al igual que en otras afecciones del tracto respiratorio incluyendo al asma bronquial, el daño pulmonar parece ser mediado por el influjo de neutrófilos en el pulmón, los cuales son activados y generan prostaglandinas, leucotrienos, enzimas proteolíticas como elastasa y desde luego especies reactivas de oxígeno. El humo del cigarrillo incrementa de dos a cuatro veces el número de células de respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio (Hunninghake et al, 1983). Los macrófagos alveolares de los fumadores son capaces de liberar oxidantes en abundancia; el mecanismo involucrado en este fenómeno se desconoce pero se asocia a la ingestión crónica de partículas en suspensión inhaladas con el humo del cigarrillo (Hubbard, 1987). El número de mRNA transcritos del gene b245 (que codifica para el componente principal del sistema de NADPH-oxidasa, que media la producción de oxidantes en fagocitos) está incrementado en macrófagos alveolares de fumadores de cigarrillo, hecho consistente con el concepto de que estas células son capaces de producir oxidantes en forma exagerada.

Por otro lado , se han podido detectar incrementos en la concentración de productos de peroxidación (cromolípidos fluorescentes) en individuos fumadores (Pre, 1989). Al investigar el efecto de la exposición a humo de cigarrillo en plasma sanguíneo humano, se encontraron incrementos importantes en la concentración de hidroperóxidos lipídicos (Frei et al, 1991). En estudios similares (Cross et al, 1993) se encontró que la exposición de plasma humano a la fase gaseosa del humo del cigarrillo genera peroxidación lipídica y también peroxidación de proteínas. En adición, desde hace varios años se sabe que la concentración de algunos antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido úrico se encuentra disminuida en individuos fumadores (Cross et al, 1993; Frei, 1991).

Pryor ha reportado la existencia, en el humo del cigarrillo de un radical libre de larga vida cuya estructura química parece corresponder a una semiquinona (Pryor et al, 1983). Se sabe que las quinonas pueden participar en reacciones de oxidación-reducción. En este proceso las quinonas son reducidas a hidroquinonas, o bien las hidroquinonas oxidadas a semiquinonas las cuales en turno son capaces de reducir el oxígeno hasta anión superóxido. La dismutación de este radical llevaría a la producción de peróxido de hidrógeno y éste podría descomponerse en presencia de metales de transición hasta radical hidroxilo, como se mencionó con anterioridad es uno de los radicales más reactivos (Pryor, 1987).

8. Mecanismo fisiológico de protección antioxidante.

Un antioxidante ha sido definido como aquella sustancia que presente en concentraciones bajas (comparadas con las de un sustrato oxidable), decremента de forma significativa o bien previene la oxidación de aquél sustrato (Halliwell, 1991).

Existen en general dos grupos de antioxidantes, clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción. En primer término se presentan los antioxidantes preventivos, los cuales actúan al inicio del proceso de oxidación, reduciendo la frecuencia de inicio de una cadena de oxidación, y los antioxidantes que actúan bloqueando dicha cadena y captan radicales directamente, acortando por tanto la longitud de la cadena de oxidación.

ANTIOXIDANTES

- | | |
|---|---|
| <p>1 Los que actúan previniendo el inicio de la cadena de oxidación:</p> <p>1a. Reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos: hidroperóxidos. (catalasa, glutatión peroxidasa etc.)</p> <p>1b. Secuestradores o inactivadores de metales de transición. (transferrina, ceruloplasmina, etc.)</p> | <p>2. Los que actúan bloqueando o rompiendo la cadena de oxidación. (Chain breakings).</p> <p>(vitamina E, vitamina C, superóxido dismutas).</p> |
|---|---|

De acuerdo a su naturaleza química, los antioxidantes han sido clasificados también como: a) no enzimáticos (secuestradores de radicales libres y especies reactivas: vitaminas C y E, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, etc.) y b) enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa).

Las enzimas antioxidantes se caracterizan por su alta especificidad, por su localización dentro de la célula y por tener implicado en su mecanismo de acción un metal específico que puede ser cobre, zinc, hierro, manganeso o selenio.

Las superóxido dismutasas son un grupo de enzimas que catalizan la siguiente reacción:



En el humano se han identificado varias isoenzimas que se diferencian tanto por las características de la apoenzima (glicoproteína) como por el grupo prostético (metales de transición). Las isoenzimas que contienen Cu^+ y Zn^{2+} son al menos 4, tres de las cuales se encuentran relacionadas estructuralmente. Tienen un peso aproximado de 32000, y están formadas por dos unidades o monómeros de 16 KD cada uno. El átomo de cobre es reducido a Cu^+ y reoxidado a Cu^{2+} durante el ciclo catalítico; son citosólicas, sensibles a cianuro y su locus genético se asume se encuentra en el cromosoma 21. La cuarta isoenzima Cu-Zn presenta una masa relativa de 150000 y es tetramérica, contiene cuatro átomos de cobre y posiblemente también cuatro átomos de zinc; esta SOD es inmunológicamente distinta a las demás pero mantiene su sensibilidad al cianuro (Marklund et al, 1982). Las SOD-Cu,Zn se encuentran distribuidas en todos los tejidos y se calcula que el ser humano tiene aproximadamente 4 gramos de estas enzimas en total (Tabla 4).

Un segundo tipo de SOD es mitocondrial y contiene manganeso en su sitio activo, una estructura molecular diferente, además de que presenta una concentración 10 veces mayor que la SOD-CuZn. Las bacterias poseen una superóxido dismutasa que también contiene manganeso en su sitio activo y es similar en cuanto a su secuencia de aminoácidos se refiere (Tabla 4).

Tabla 4. Algunas características de las familias de superóxido dismutasas.

Tabla 4. Algunas características de las familias de superóxido dismutasas.

TIPO	PESO MOLECULAR	ESTRUCTURA	LOCALIZACION	DISTRIBUCION
SOD Cu, Zn	32 000	DIMERICA	CITOSOL	EUCARIONTES Y ALGUNOS PROCARIONTES
*EC SOD (Cu, Zn)	150 000	TETRAMERICA (glicoproteinas)	EXTRACELULAR Y ASOCIADA A MEMBRANA	MAMIFEROS, AVES Y PECES
SOD- Mn	40 000 O 80 000	DIMERICA O TETRAMERICA	CITOSOL O MATRIZ MITOCONDRIAL	TODOS LOS AEROBIOS
SOD- Fe	40 000 O 80 000	DIMERICA O TETRAMERICA	CITOSOL O CLOROPLASTOS O MITOCONDRIAS	PROCARIONTES, ALGUNOS EUCARIONTES (PLANTAS)

* Superóxido dismutasa extracelular: EC-SOD

Otra enzima de protección antioxidante es la catalasa, que se encuentra en peroxisomas y cataliza la siguiente dismutación:



Otro grupo de enzimas son las peroxidasas, una de las cuales, la mas importante en mamíferos es la glutatión peroxidasa, que cataliza la siguiente reacción:



Por otra parte la glutatión reductasa convierte al glutatión oxidado GSSG en glutatión reducido GSH, con la intervención de NADPH, permitiendo así que la acción antioxidante de la peroxidasa sea regenerable.

El α -tocoferol constituye en el ser humano el mas importante y efectivo compuesto antioxidante bloqueador de la cadena de oxidación (Halliwell, 1991). Sin embargo, la capacidad

antioxidante total de la vitamina E es la suma de las actividades de los 8 tocoferoles que la constituyen (Diplock, 1994).

En la reacción en la cual el α - tocoferol (a) interactua con radicales como el peroxilo (b), éstos últimos son transformados en hidroperóxidos (d), mientras el α -tocoferol es convertido en radical tocoferoxilo (c). El radical α -tocoferoxilo puede aceptar un átomo de hidrógeno y formar nuevamente α -tocoferol, la reacción 1 es por tanto reversible. Si una ulterior oxidación tiene lugar entonces el anillo de cromanol del tocoferol es abierto, dando lugar a una α - tocoferil quinona (e) (α -TQ)

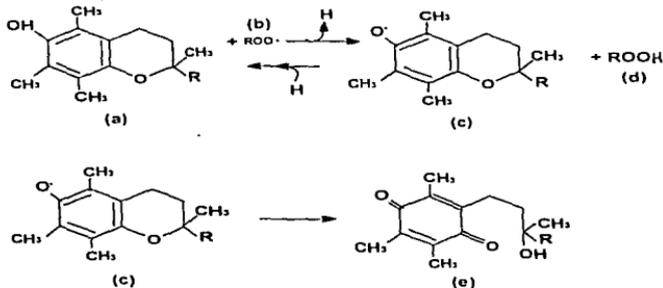


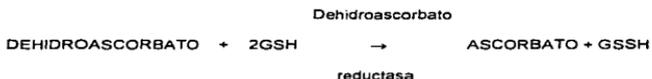
Figura 1.6

Esta reacción II es irreversible. Las concentraciones de α -TQ en tejidos animales es muy baja, lo que indica que la vitamina E es llevada mínimamente hasta este estado de oxidación. Es muy probable que la vitamina C y también carotenoides puedan regenerar oportunamente al tocoferoxirradical de nuevo a α -tocoferol (I) (Figura 1.6)

El ácido ascórbico, o vitamina C constituye otra de las moléculas que posee capacidad antioxidante en los tejidos animales. Sin embargo es en principio, un cofactor enzimático para

varias hidroxilasas, especialmente la prolina hidroxilasa y la lisina hidroxilasa hierro dependientes, así como para la dopamina β-hidroxilasa. La función específica del ascorbato es mantener el hierro en su forma reducida, factor indispensable para la hidroxilación.

Dos oxidaciones sucesivas del ácido ascórbico lo convierten en dehidroascorbato, pasando por el radical semidehidroascorbato durante el curso de una reacción. El dehidroascorbato podría ser degradado hasta ácido oxálico y tréonico, a no ser por la intervención de un mecanismo enzimático que metaboliza la regeneración del dehidroascorbato nuevamente a ascorbato. La enzima responsable es la dehidroascorbato reductasa dependiente de glutatión y la reacción es la siguiente:



El ácido ascórbico como antioxidante bloqueador puede interactuar capturando o neutralizando a radicales como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el singulete de oxígeno así como hidroperóxidos lipídicos. Sin embargo debe siempre tenerse en cuenta la capacidad pro-oxidativa del ácido ascórbico al interactuar con metales de transición, principalmente el hierro al que puede mantener en su estado reducido:

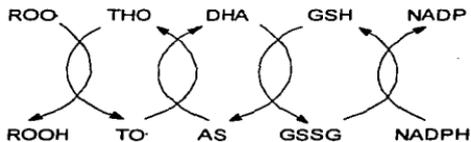


La combinación de ácido ascórbico y Fe^{+2} o bien Fe^{+3} genera intensa oxidación de ácidos grasos poli-insaturados.

El radical formado (AS^{\cdot}) y que también se genera en el curso de la reacción del ascorbato con radicales libres, es el anión radical dihidroascorbato, muy poco reactivo. Este decae por disproporción hasta vitamina C y dehidroascorbato, como se muestra a continuación:



Se ha investigado de manera intensa recientemente la participación del ácido ascórbico en la regeneración del α -tocoferol a partir de su radical α -tocoferoxilo. El mecanismo implicaría la donación por parte del ascorbato del hidrógeno requerido para evitar la formación irreversible de la α -TQ., de acuerdo al esquema siguiente.



ROO•, PEROXIDO, ROOH, HIDROPEROXIDO, THO, α -TOCOFEROL, TO•, TOCOFEROXILO, DHA, DEHIDROASCORBATO
 AS, ASCORBATO, GSH, GLUTATION REDUCIDO, GSSG, GLUTATION OXIDADO, NADP Y NADPH, DINUCLEOTIDOS

Figura 1.7

Otros antioxidantes que pueden identificarse en tejidos biológicos y han sido motivo de intensa investigación son el ácido úrico (Ames, 1981), la transferrina y la ceruloplasmina (Gutteridge, 1978; Halliwell and Gutteridge, 1986). El ácido úrico que se acumula en los tejidos humanos como producto del metabolismo de las purinas puede encontrarse en concentraciones de hasta 0.45 nM y es un importante captador de radicales peroxilo, hidroxilo y singlete de oxígeno; también se ha reportado la capacidad de este compuesto para capturar hidroperóxidos y ozono. La ausencia de la enzima urato oxidasa en el ser humano podría ser benéfico, al permitir un mecanismo antioxidante singular (Diplock, 1994).

Estrés oxidativo.

El conocimiento cada vez mayor de las especies reactivas del oxígeno por un lado y de compuestos antioxidantes por el otro ha llevado al concepto de estrés oxidativo. Se define como un disturbio en el balance antioxidante y pro-oxidante (Figura 1.8), en favor de este último. Para mantener la homeostasis, existe el requerimiento de una continua regeneración de la capacidad antioxidante, y si esta no se logra, el daño oxidativo tenderá a acumularse, resultando en la presencia de eventos patológicos (Sies, 1991). La determinación de un estado de estrés oxidativo en seres humanos es difícil y no se ha establecido actualmente un parámetro que pueda utilizarse como indicador de esta condición.

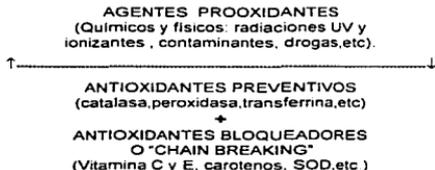


Figura 1.8

II. DEFINICION DE LA HIPOTESIS DE TRABAJO.

En la zona metropolitana de la Ciudad de México se rebasan continuamente los límites de las normas internacionales de la calidad del aire y el límite para el Índice Metropolitano de Calidad del Aire para el ozono (Gráficas I.1 y I.2). Esto significa que una alta proporción de la población permanece expuesta a una elevada concentración de oxidantes fotoquímicos como contaminantes atmosféricos durante periodos prolongados a lo largo del año.

Los estudios en animales y en humanos han podido comprobar que el ozono, el principal oxidante presente en una atmósfera contaminada, es capaz de generar cambios bioquímicos, fisiológicos y funcionales de los sistemas biológicos (Parte I.2; tablas 1 y 2). En este sentido, se ha postulado como posible mecanismo bioquímico de daño por ozono, la oxidación de moléculas biológicas, entre ellas lípidos (Parte I. 2 y I.4)

En una población de hombres y mujeres, clínicamente sanos, con edades promedio entre 22 y 35 años y que residen por un periodo determinado en la Ciudad de México (residentes permanentes y recién llegados) o que nunca han estado en ésta ciudad, cabe esperar se cumplan las siguientes premisas:

1. Al organizar a los grupos de estudio por periodos de estancia en la Ciudad de México, éstos presentarán diferencias significativas en cuanto a la concentración de lipoperoxidos lipídicos y la capacidad de respuesta antioxidante del suero sanguíneo obtenido de su sangre.

2. La concentración de lipoperoxidos se encontrará relacionada con el periodo de estancia de los grupos en estudio en la Ciudad de México. Del mismo modo, la capacidad antioxidante del suero se incrementará en relación al tiempo de estancia, en respuesta a una desigual exposición a los contaminantes atmosféricos (oxidantes derivados de smog fotoquímico)

3. Al comparar dos grupos de sujetos con y sin hábito de tabaquismo, se espera encontrar diferencias al comparar la concentración de lipoperóxidos y la capacidad antioxidante del suero sanguíneo.

III. OBJETIVO.

Medir algunos productos de la oxidación de lípidos (reactivos al ácido tiobarbitúrico, dienos conjugados y cromolípidos fluorescentes) y la capacidad antioxidante (mediada por superóxido dismutasa y capacidad sérica antioxidante) en suero sanguíneo humano de dos poblaciones con diferente tiempo de exposición a contaminantes atmosféricos, con y sin hábito de tabaquismo; determinar si existen diferencia significativas en los niveles de los citados parámetros entre ambas poblaciones al nivel de sensibilidad de las técnicas seleccionadas.

IV. MATERIAL Y METODOS.

1.-REACTIVOS Y EQUIPO

Se utilizaron los siguientes reactivos grado analítico Sigma Chem.: Nicotin adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH); Adenosín difosfato (ADP); nicotinamida; ácido 2-tiobarbitúrico; 1,1,3,3 tetrametóxiopropano; sulfato de quinina; hipoxantina; xantina oxidasa; nitroazul de tetrazolio; tris HCL; albumina bovina; hidroxitolueno butilado (BHT); ácido linoléico; ácido araquidónico, Trizma[tris(hidroximetil)aminometano]; Merck Darmstadt: ácido tricloroacético; ácido sulfúrico; ácido clorhídrico; tungstato de sodio; cloruro de potasio; sacarosa; mono y difosfato de sodio; sulfato férrico. Sigma de México: sistema Hycl 116-117 para hemoglobina. Boehringer Mannheim: Superóxido dismutasa (SOD). EM Science: etanol, metanol, cloroformo y ciclohexano de grado cromatográfico.

Equipo. Centrifuga preparativa Beckman J2-HS y ultracentrifuga Beckman L5-75; espectrofotómetro Beckman DU-64; espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer MPF-3.

2. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Con base en un acuerdo con la Jefatura de Enseñanza del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. se tomaron muestras de sangre a médicos residentes de dicho hospital.

Muestras. Se realizaron 200 tomas (112 hombres y 88 mujeres). De este número se consideraron aquellas muestras que de acuerdo a un historial clínico llevado a cabo para cada participante (efectuado por la jefatura de enseñanza y los laboratorio de investigación en bioquímica y de analisis clinicos del hospital citado). una hoja de captación de datos y una entrevista personal cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión.

a) Muestras de hombres y mujeres con edades entre 22 y 35 años.

b) Muestras de residentes de por lo menos 20 años en las zonas centro y suroeste del Distrito Federal y no fumadores (ni ocasionales).

c) Muestras de residentes del interior de la República Mexicana con no más y no menos de ocho días de residir en la zona centro y suroeste de la Ciudad de México y con perímetro de actividad laboral circunscrito al área del Centro Médico Nacional y no fumadores (ni ocasionales).

d) Muestras de residentes de ciudades de la provincia, con por lo menos 10 años de no haber visitado la zona urbana o conurbada de la Ciudad de México y no fumadores (ni ocasionales).

e) Muestras de residentes de ciudades de la provincia fumadores ocasionales o con hábito de tabaquismo.

Criterios de no inclusión.

a) Cualquier padecimiento agudo o crónico presente en por lo menos las últimas 4 semanas previas al día de la toma de muestras, incluyendo padecimientos respiratorios comunes como gripe, tos, etc.

b) Muestras de sujetos que se encontraran consumiendo (o hubiesen consumido en las 4 semanas previas) cualquier clase de medicamento, suplemento alimenticio, droga, vacuna, etc.

Criterios de exclusión.

a) Sueros lipémicos.

b) Sueros que mostraran cualquier evidencia de hemólisis.

Para el estudio del efecto de la contaminación se formaron tres grupos: Un grupo compuesto por 24 sujetos los cuales fueron residentes permanentes de la Ciudad de México y específicamente de mas de 20 años de residir en la zona centro y suroeste del Distrito Federal

(Grupo C); otro grupo compuesto por 21 sujetos de reciente estadía en la Ciudad de México y específicamente de 8 días de residencia y de laborar en la zona centro y suroeste del Distrito Federal (primera semana de marzo de 1994) (Grupo B). Finalmente un grupo control compuesto por 35 sujetos que no visitaban la Ciudad de México por lo menos en los últimos 10 años y residentes de distintos lugares de la provincia, pertenecientes a los estados de Guerrero, Michoacán, Puebla, Veracruz, Chihuahua, San Luis Potosí, Coahuila y Monterrey (Grupo A). Los participantes en el estudio recibieron una dieta habitual proporcionada por los comedores del IMSS de cada hospital, no presentando variaciones determinantes. En cuanto a su actividad física, todos los voluntarios, de los tres grupos en estudio tuvieron similar rutina de trabajo, relacionada con las actividades propias de su profesión y de entrenamiento docente. El promedio diario de permanencia en lugares cerrados y abiertos fue de 21 ± 1.10 horas y 3 ± 1.0 horas respectivamente. Para el caso de los efectos del tabaquismo se formaron dos grupos de residentes con y sin hábito de tabaquismo conformados por 25 y 35 personas respectivamente. No se consideró la cantidad de cigarrillos consumidos dado que en la mayoría de los casos se trató de fumadores ocasionales; por lo que se clasificaron como "fumadores" aquellos que consumieran entre 1 y 5 cigarrillos por semana o más, y no fumadores aquellos que no fumaran ni ocasionalmente. Los residentes para la formación de estos grupos fueron únicamente de ciudades de la provincia y muestreados durante la primera semana de marzo de 1994.

Determinación de la exposición al ozono.

a) Para el grupo C. La concentración de ozono en este grupo se determinó calculando el promedio diario de 24 valores horarios de ozono para el periodo comprendido entre marzo de 1988 y marzo de 1994 (Departamento del Distrito Federal. Dirección de Ecología, Subdirección de Calidad del Aire) Dentro del promedio se incluyen registros de horas del día en que la contaminación puede ser muy baja. Esto determina que los valores que se presentan no parezcan tan elevados como de hecho lo son en las horas más críticas durante varias horas a lo largo del día (tabla 4).

b) Para el grupo B. La concentración de ozono en este caso se determinó tomando en cuenta el promedio de los valores de contaminación por ozono presentes durante el tiempo de estancia de los residentes en el D.F. (primeros ocho días de marzo de 1994) (Departamento del Distrito Federal. Centro de Información Sobre el Medio Ambiente, CIMA). El tiempo de exposición corresponde igualmente a 24h/día (Tabla 4).

c) Para el grupo A. La concentración de ozono se determinó en este caso con el promedio de los valores de las concentraciones de ozono para la ciudad de provincia con un grado de contaminación más elevado, para el periodo de tiempo de un año previo a que fueron muestreados los residentes (y durante el muestreo) y que corresponde a la ciudad de Monterrey (Subdelegación de Protección Ambiental del estado de Nuevo León, Monterrey, N.L.). Todas las concentraciones de ozono presentes en las demás ciudades fueron menores (datos no mostrados) (Tabla IV.1).

GRUPO	ZONA	PROMEDIO O3 ppm*	TIEMPO DE EXPOSICION
C	centro-suroeste	0.152±0.021	24h/díaX5años
B	centro-suroeste	0.140±0.036	24h/díaX8días
A (control)	zona urbana	siempre menor a 0.029±0.009	24h/díaX1año

Tabla IV.1. Exposición al ozono de acuerdo a los grupos estudiados. *Promedio ± D.S.

Toma y procesamiento de las muestras

La sangre (10 ml), se colectó a partir de las 9:00 horas de la mañana, en tubos estériles al vacío (Vacutainer. Becton Dickinson). Posteriormente se permitió la separación del coágulo de las muestras (20 min.) y se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 15 minutos para la obtención de los sueros, los cuales se fraccionaron en tres porciones. A las muestras destinadas a la cuantificación de los productos de peroxidación se les adicionó 2.2 mg por mililitro (10mM) de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante y posteriormente fueron congeladas a -70°C . Las muestras destinadas a la cuantificación de la capacidad antioxidante del suero fueron puestas en refrigeración entre 2 y 4 $^{\circ}\text{C}$ para ser analizadas en los días subsecuentes. Las muestras destinadas a la cuantificación de superóxido dismutasa se valoraron en las horas siguientes a la toma y el remanente fué puesto en congelación (-70°C).

Determinación de hemoglobina.

Todos los sueros que presentaron evidencia de hemólisis fueron excluidos. Para descartar la posible interferencia de hemoglobina en los ensayos de superóxido dismutasa y productos reactivos al tiobarbitúrico, a los 62 sueros congelados a -70°C se les aplicó un ensayo para la cuantificación de hemoglobina, basado en la formación de cianometahemoglobina por ferricianuro (Eilers RJ, 1967). No se encontraron valores por encima del límite de detección de la técnica y que es de $0.01\mu\text{g}$ por ml. Cinco muestras recientes de sangre completa mostraron un valor promedio de 0.14 ± 0.002 mg. de hemoglobina por mililitro. Los autores señalan que la congelación de las muestras no interfiere con la determinación.

Cuantificación de la lipoperoxidación lipídica.

A partir de la figura IV.1 es posible señalar los productos de la cadena de peroxidación que pueden ser indicadores del grado de oxidación del material lipídico.

El grado de peroxidación lipídica puede ser determinado por varios procedimientos. Estos pueden dividirse en, los que miden los productos primarios de la peroxidación como es el caso de dienos conjugados e hidroperóxido y, aquellos que miden productos de peroxidación secundarios como son el malonaldehído, 4-hidroxi-nonenal e hidrocarburos volátiles (etano y pentano).

La interacción de algunos productos de peroxidación como el malonaldehído con grupos amino primarios de proteínas, determina la formación de lo que parece ser un tercer tipo de compuestos, es decir, las sustancias fluorescentes derivadas de lipoperoxidación o cromolípidos. Estos ensayos han sido ampliamente utilizados, especialmente en sistemas *in vitro*, por su gran sensibilidad. En la actualidad, las pruebas incorporan cada vez con más frecuencia el uso de cromatografía líquida, ya sea con detección ultravioleta, de fluorescencia o electroquímica (Punchard and Kelly, 1996).

La composición química de los productos derivados de peroxidación lipídica dependerá de la composición de los lípidos blanco, así como de la participación de iones metálicos en la reacción. Sin embargo, hasta el momento no es posible predecir la prevalencia de algún tipo de producto de peroxidación en particular. Esta es la razón por la cual consideramos importante utilizar una prueba para los productos de peroxidación primario, secundario y terciario, esto es, dienos conjugados, reactivos al ATB y cromolípidos.

3. PRODUCTOS REACTIVOS AL ACIDO TIOBARBITURICO.

Al final del proceso de lipoperoxidación, se generan numerosos productos secundarios (Fig. 1.5), entre ellos se encuentra el malonaldehído, el cual puede ser utilizado como indicador de la peroxidación de lípidos *in vivo* e *in vitro*. En la figura IV.1 se ilustra un proceso teórico de formación de malonaldehído a partir de un ácido graso no saturado (modificado de Kappus, 1985).

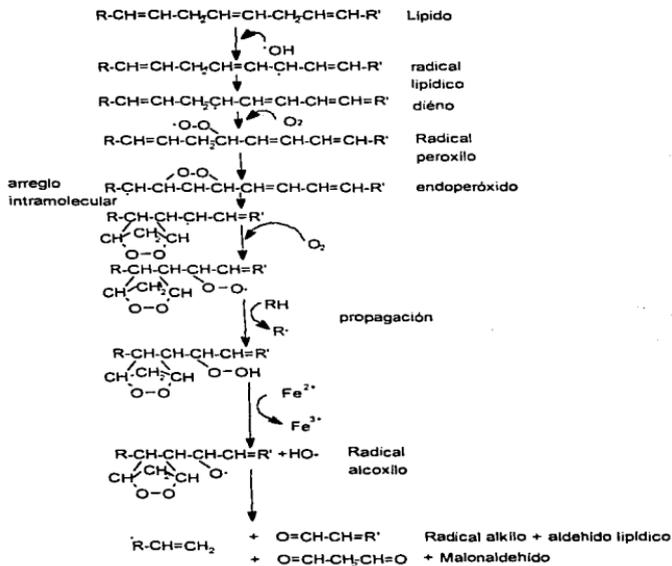


Figura IV.1. Peroxidación de un ácido graso insaturado, hasta la formación de malonaldehído.

Existe una buena cantidad de variantes a la reacción clásica para la cuantificación de malonaldehído, esto es, la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA), la cual se verifica en medio ácido y forma un pigmento colorido que puede ser medido a 533 nm. Además de las espectrofotométricas, otras metodologías para la cuantificación de MDA son: las de

espectrofluorescencia (Yagy, 1984) cromatografía de gases (Umano, Dennis y Shibamoto, 1988; Dennis y Shibamoto, 1989) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)(Bird et al., 1983; Lepage et al., 1991). Una metodología ampliamente utilizada y que se basa en la determinación espectrofotométrica del conjugado MDA-TBA es la de Ohkawa, Ohishi y Yagi de 1979; en el presente estudio se utilizó una modificación a dicha técnica; se trata de una metodología ampliamente probada, accesible, de bajo costo y sensible. El límite de sensibilidad de la técnica empleada es de aproximadamente 0.5 nmol/ml.

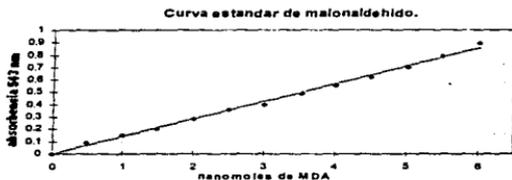
De una muestra de suero previamente puesta a 37°C se tomaron 100 microlitros y se llevaron a 0.9 ml. de Tris HCl., 50 mM, pH 7.4. A esta solución se adicionaron 200 µl H₂SO₄ 0.66 N y 150 ml de una solución de Na₂WO₄ 0.3 M y se agitó vigorosamente con el fin de llevar a cabo la precipitación de proteínas (ver mas adelante porcentaje de recuperación).(Lepage, et al, 1991) . La muestra fué centrifugada a 2500 x g por espacio de 10 minutos. El sobrenadante se separó y se adicionó 1 ml de ácido tiobarbitúrico 75 %; ésta solución fué agitada vigorosamente. La reacción se llevó a cabo a 95°C durante 15 min. en tubos de borosilicato (100 x 13 mm) con tapones plásticos de rosca. Se enfrió la muestra antes de ser valorada espectrofotométricamente a 533 nm (Koster and Slee, 1980). Se realizó una curva patrón utilizando malonaldehído como estandar. La relación entre las concentraciones de suero y niveles correspondientes de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico aparecen en la figura IV.2; se trata de 10 muestras ± D.E. En la figura IV.2 se muestran los espectros de absorción típicos de una muestra de malonaldehído y de suero sanguíneo, mostrando sus máximos de absorción a 533 nm.

Preparación del malonaldehído.

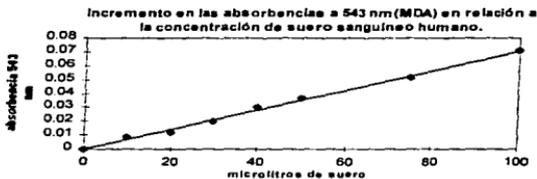
Los estandares de malonaldehído se prepararon a partir de la hidrólisis ácida del 1,1,3,3 tetrametoxipropano (malonaldehído bis-dimetilacetel). El compuesto comercial fué destilado y se conservó a 4° C. A 220 mg del compuesto(1 mM) se adicionaron 100 ml de una solución al 1% de ácido sulfúrico. La solución se dejó en reposo por espacio de 2 hrs a temperatura ambiente, después de lo cual 1 ml de la solución se llevó a 100 ml del ácido sulfurico 1% (v/v). La

concentración de malonaldehído se verificó midiendo su absorbancia a 245 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar de $13.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en una celdilla de 1 cm de paso de luz. Una curva estandar típica con un rango de 0.0 a 6.0 nanomoles aparece en la gráfica IV.1.

Gráfica IV.1



Gráfica IV.2



Porcentaje de recuperación de malonaldehído.

A 0.5 ml de una muestra de suero sanguíneo humano se adicionó una alícuota del estandar de MDA, para una concentración final de $20 \mu\text{M}$ (0.5 ml); se adicionaron además 1.1 mg de hidroxitolueno butilado (BHT), H_2SO_4 0.24 M (0.5 ml) y tungstato de sodio Na_2WO_4 0.12

M (0.5 ml) para un volumen de 4 ml y una solución sulfúrico-tungstato en el precipitado de 30 y 15 mM respectivamente. El porcentaje de recuperación para 5 ensayos fué de $98.6 \pm 2 \%$.

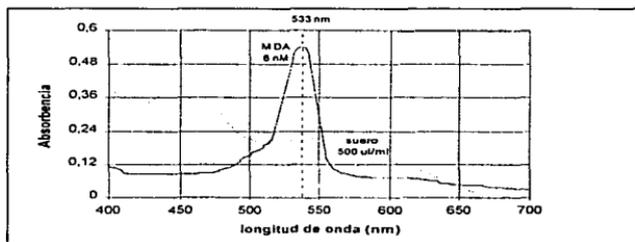


Figura IV.2

4. DETERMINACION DE DIENOS CONJUGADOS.

Unos de los primeros productos en la cadena de peroxidación son los dienos conjugados. Se derivan de la formación de dobles y simples ligaduras alternadas dentro de la cadena hidrocarbonada del radical lipídico previamente formado a partir del ácido graso insaturado. A partir del uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han podido separar cantidades aproximadamente equimolares de cuatro isómeros (cis, trans y trans-trans), formados a partir de la oxidación de metil linoleato (Chan y Levett, 1977). Se ha determinado su máximo de absorción a 235 y 233 nm, con coeficientes de extinción molar de 26000 y $28000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente. Se recomienda para las determinaciones la utilización de un promedio de ambos parámetros. Las reacciones que llevan a la formación de dienos conjugados se incluyen también en la figura IV.1.

Se efectuó una extracción lipídica utilizando una mezcla de cloroformo y metanol (2-1). La muestra fué centrifuga a 2500 x g durante 10 min.. El sobrenadante se reconcentró y se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno (cromatográfico 99.998%). El residuo se resuspendió en ciclohexano y se determinó su absorbancia a 234 nm utilizando para los cálculos un coeficiente de extinción molar de $2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pryor and Castle, 1984). En la figura IV.3 se muestran algunos espectros típicos de los lípidos contenidos en varias alícuotas de suero sanguíneo humano mostrando un pico de absorción característica de dienos conjugados a 234 nm; la concentración de estos es proporcional a la de suero (Gráfica IV.3).

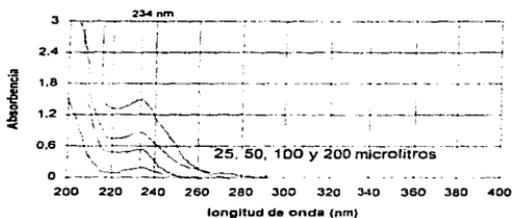
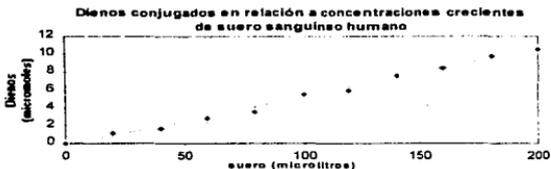


Figura IV.3

Para demostrar que la absorbancia localizada a los 234 nm es debida a la oxidación de lípidos, se procedió a la inducción de la peroxidación de una mezcla de ácidos grasos puros con un sistema generador de radical hidroxilo (Fenton).

Gráfica IV.3



Vesículas de ácidos grasos fueron preparadas por el método de Gebicki y Hicks (1976) como sigue: Una mezcla de ácido linoleico (40 mg), ácido araquidónico (0.4 mg) y 4 mililitros de Tris HCl 0.1 M, pH 8 fué sometida a agitación intensa (vortex) por espacio de 30 minutos; la suspensión resultante se disolvió en 20 mililitros del mismo amortiguador para lograr una concentración final de 7.2 mM de ácidos grasos. Las vesículas se prepararon inmediatamente antes de ser usadas. El radical hidroxilo fué generado a través de la acción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 0.5 mM) en presencia de Fe^{2+} -EDTA(100 μ M).



La concentración del peróxido de hidrógeno se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 240 nm usando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 81 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

En la figura IV.4 se presentan los barridos espectrales de la mezcla de ácidos grasos, así como el aumento en absorbancia con respecto al tiempo al ser peroxidados con radical hidroxilo (reacción de Fenton).

5. DETERMINACION DE CROMOLIPIDOS FLUORESCENTES.

La determinación de la fluorescencia puede utilizarse como un parámetro de la peroxidación tanto *in vivo* como *in vitro*.

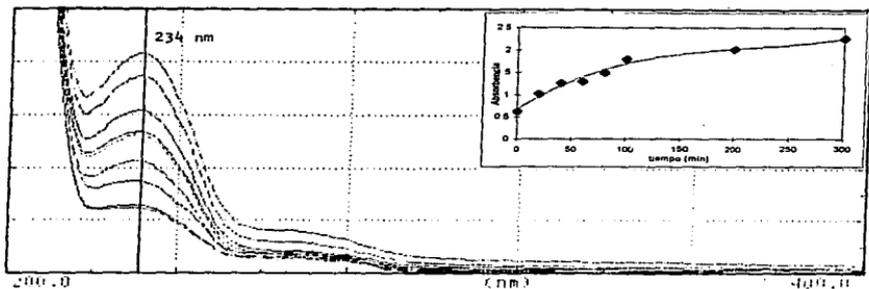
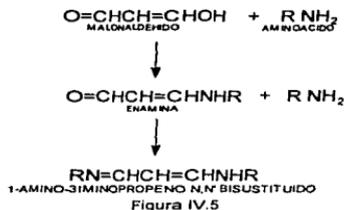


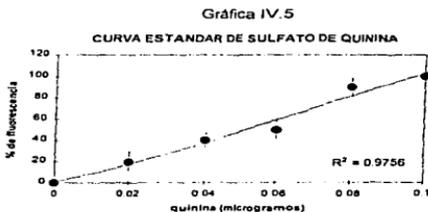
Figura IV.4

El malonaldehído puede reaccionar con los grupos amino libres de compuestos biológicos como aminoácidos, proteínas, aminofosfolípidos, ácidos nucleicos, etc., para formar con estos bases conjugadas de schiff. El sistema cromofórico responsable de la fluorescencia es $\text{NC}=\text{CC}=\text{N}$, el cual contiene seis electrones π .

Algunos pigmentos con características cromofóricas muy próximas a las del sistema citado se han podido identificar en el interior de ciertas células en las cuales parecen acumularse al tiempo en que envejecen, de ahí que se les denomine pigmentos de la edad o lipofuscinas (Esterbauer et al, 1986). Estos pigmentos pueden ser extraídos de la fase liposoluble de los tejidos biológicos con solventes orgánicos y valorados posteriormente con máximos de excitación y emisión a 350 y 430 nm respectivamente. Con base en estudios espectroscópicos se comprobó que 1 mol de malonaldehído reacciona con 2 moles del ester de un aminoácido para rendir 1,amino,3 iminopropenos bisustituidos con las características espectrales ya citadas (Chlo and Tappel, 1969) (figura IV.5).



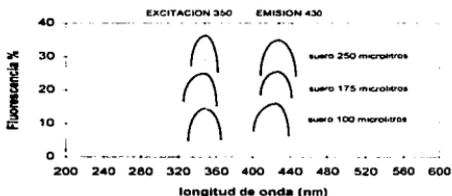
Se extrajo la fracción lipídica a una muestra de 250 microlitros de suero utilizando una mezcla de cloroformo-metanol 1-2 para lograr un volumen final de 1.875 ml. Se centrifugó a 3000 X g 10 min y al sobrenadante se adicionó una mezcla 1:1 agua-cloroformo y se agitó vigorosamente; se centrifugó nuevamente a 4000 X g 5 min. De la fase orgánica se tomó 1 ml. y se adicionó 0.1 ml. de metanol para aclarar la muestra. Los lípidos extraídos se valoraron en relación a un estándar de sulfato de quinina 0.1 µg/ml en H₂SO₄ 0.05M con una excitación de 350 nm y una emisión de 430 nm (Esterbauer et al, 1986). En la gráfica IV.5 se presenta el aumento en la fluorescencia de concentraciones crecientes de sulfato de quinina; se trata del promedio de 5 muestras ± D.E. Para las determinaciones en las muestras se tomo como estándar 100 % de fluorescencia= 0.1 µg/ml.



Se comprobó que incrementos en las concentraciones de suero corresponden igualmente a un aumento en la fluorescencia, con barridos espectrales con máximos de emisión a

430 nm (Figura IV.6); 100 unidades de fluorescencia son equivalentes a 0.1 μg de sulfato de quinina; la sensibilidad fué de 100% y las rendijas de emisión y excitación se ajustaron a 6nm.

Para comprobar que las determinaciones de cromolpidos corresponden al aumento en la oxidación, se midió la fluorescencia de los lípidos contenidos en una fracción microsomal hepática. En la gráfica IV.6 se muestra el aumento en la fluorescencia con respecto al tiempo, de lípidos extraídos con cloroformo-metanol en la peroxidación microsomal en presencia de NADPH y ADP-Fe^{3+} . Se utilizó como estandar 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de quinina en H_2SO_4 0.05 M de acuerdo a la curva de la gráfica IV.5; se trata del resultado de 5 ensayos \pm D.E.



Gráfica IV.6

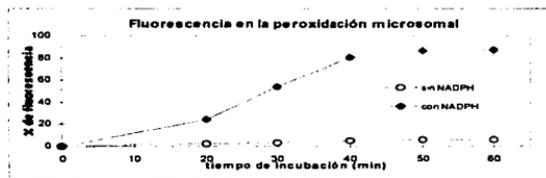


Figura IV. 6

Se aprecia el aumento progresivo de la fluorescencia en la muestra que contiene NADPH. La concentración de proteína microsomal y de los compuestos de la mezcla de reacción, así como las condiciones del ensayo son los que se presentan en el punto : capacidad antioxidante.

6. DETERMINACION DE SUPEROXIDO DISMUTASA.

Se trata de enzimas muy activas que intervienen en la dismutación del anión superóxido, de acuerdo a la siguiente reacción:

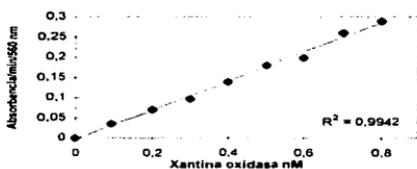


Dada la inestabilidad de su sustrato, generalmente la SOD se cuantifica a través de métodos indirectos y en base a su capacidad de eliminar anión superóxido de una mezcla de reacción.

En este caso, se utilizó un sistema que genera un flujo de O_2^- , por la acción de la enzima xantina oxidasa sobre su sustrato la xantina o la hipoxantina (Beauchamp and Freedovich, 1971). La mezcla de reacción contiene el colorante nitroazul de tetrazolio, el cual se reduce por efecto de la transferencia de electrones del anión, generando formazán. La formación del compuesto colorido determina la concentración de anión superóxido, y la inhibición determina una medida indirecta de la cantidad de SOD en cada muestra de suero.

Se utilizó una mezcla de reacción conteniendo hipoxantina 1×10^{-4} M ; carbonato de sodio 0.05 M; xantina oxidasa 2.2×10^{-9} M; ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1×10^{-4} M y nitroazul de tetrazolio (NBT) 2.5×10^{-5} M. El pH de la mezcla fué ajustado a 10.2 con una solución de ácido clorhídrico 0.1 M. En la gráfica IV.7 se muestra la tasa de reducción de NBT por el radical anión superóxido generado por la interacción hipoxantina-xantina oxidasa; se trata de un ensayo a 25° C, pH 10.2 en un volumen final de 0.5ml.

Gráfica IV.7



La reacción principia al añadir 3 microlitros de xantina oxidasa 2.2×10^{-6} M en cada mezcla para 100 μ l de suero; se toman las lecturas de la mezcla antes y después de dos minutos de iniciada la reacción, a 560 nm. La formación del colorante formazan en una mezcla que no contiene el suero determina el 0 % de inhibición, y las absorbancias de las mezclas en las que hay suero determinan el % de inhibición de cada muestra. Se sabe que una unidad de la enzima es capaz de producir 50 % de inhibición, y por tanto es posible determinar las unidades de la enzima presentes en una muestra de suero por miligramo de proteína. Un esquema general del procedimiento aparece en la figura IV.7.

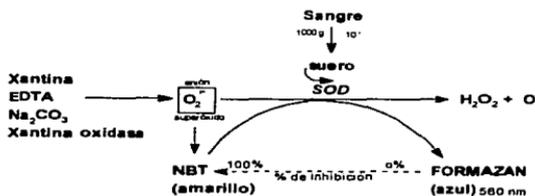
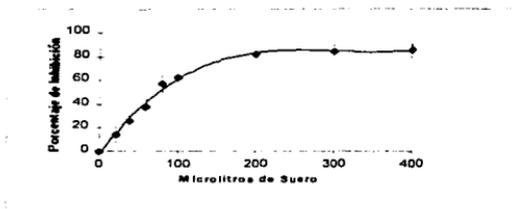


Figura IV.7

Concentraciones crecientes de suero son capaces de inhibir proporcionalmente la reducción del NBT. En la gráfica IV. 8 se demuestra la inhibición de la reducción del NBT por suero sanguíneo humano. Las condiciones son las anteriormente descritas; se trata del promedio de 5 ensayos con un mismo suero \pm D.E. Como se observa, el máximo porcentaje de inhibición es de 85 %.

Gráfica IV.8



7. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se cuantificó la concentración de proteínas (Lowry et al, 1951) para cada muestra de suero después de su obtención. Una curva estandar típica de proteínas fué de 0 a 150 μ g de albúmina bovina para un volumen final de 2.7 ml.; el volumen de suero utilizado fué de 50 μ l.

8. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIÒXIDANTE DEL SUERO.

Previamente pudo comprobarse la inhibición que el suero sanguíneo humano ejerce sobre el sistema de peroxidación microsomal dependiendo de NADPH (Hicks and Medina-Navarro, 1995). La capacidad de inhibición del suero está relacionada con las moléculas antioxidantes contenidas en el, lo que pudo comprobarse al suplementar la dieta de voluntarios con vitaminas antioxidantes y observar un aumento significativo de la capacidad antioxidante de su suero.

Peroxidación microsomal dependiente de NADPH.

Existen dos procesos de peroxidación en microsomas, uno enzimático y otro no enzimático. El no enzimático es inducido por ascorbato y hierro y es activo aun en fracción microsomal desnaturalizada por calor; el otro, enzimático, es dependiente de NADPH, se inactiva con calor de ebullición y requiere de hierro y un agente quelante. Los ácidos grasos de los fosfolípidos contenidos en las membranas de la fracción microsomal son fuertemente oxidados dando lugar a la formación de peróxidos lipídicos y productos secundarios como el malonaldehído. Pederson y otros autores (Pederson and Aust, 1973) han propuesto que la generación de radicales en la peroxidación microsomal enzimática ocurre vía la formación de un ión ADP-perferrilo que cataliza la extracción de un metil hidrógeno de un ácido graso insaturado, de acuerdo al siguiente esquema general:

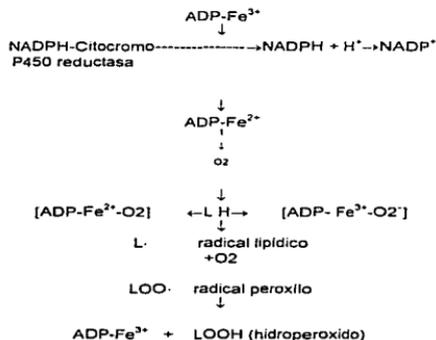
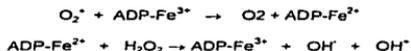


Figura IV.8

Otros autores como Fong, McCay y King han propuesto la posibilidad de que la iniciación se verifique vía una reacción tipo Haber-Weiss (Fong et al, 1973; McCay et al, 1972; King et al, 1975).

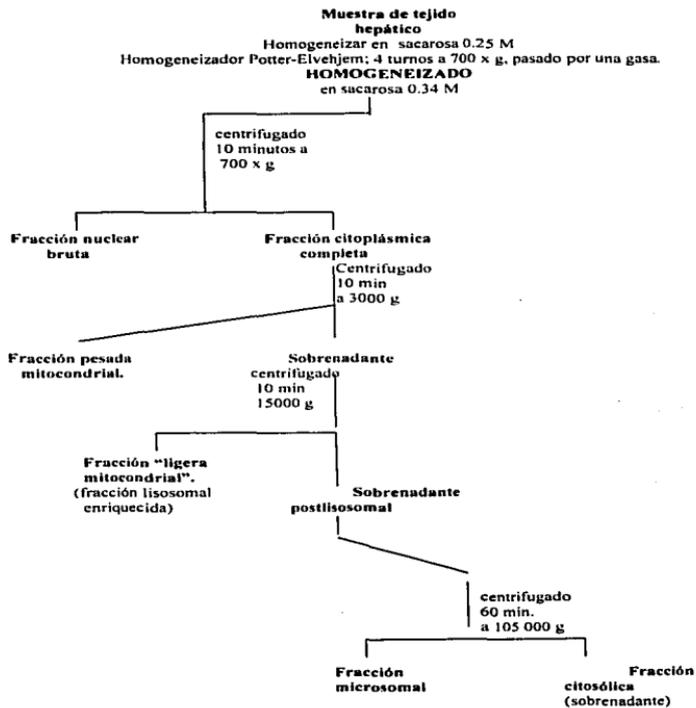


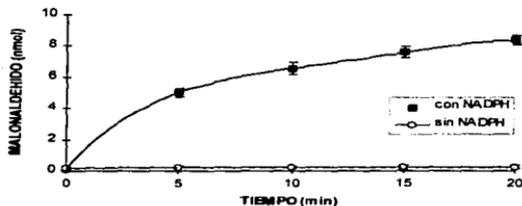
En este caso el radical implicado como iniciador es el hidroxilo (OH^-).

Ratas Wistar adultas fueron sacrificadas por dislocación cervical y sus hígados fueron perfundidos con solución de NaCl 0.15 M, extraídos y pesados. La fracción microsomal se obtuvo a partir de homogenados hepáticos al 50% (p/v) en sacarosa 0.25 M con homogenizador Elvehjem vidrio teflón. Se llevó a cabo un esquema de fraccionamiento como el que se presenta en la figura IV.9. La fracción microsomal final fué resuspendida en KCl 125 mM a razón de 1 ml por cada gramo de tejido original. Una alícuota de la suspensión obtenida conteniendo 1.5 mg de proteína microsomal se utilizó como sustrato para la lipoperoxidación, la cual fué cuantificada con el ensayo de los productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (como se explicó previamente).

Para la inducción de radicales y la oxidación de las membranas microsomales se utilizó el sistema NADPH-ADP- Fe^{3+} (Wills, 1969), con una mezcla de reacción conteniendo: nicotinamida 20 mM, KCl 80 mM, ADP 2 mM, FeCl_3 0.12 mM y NADPH 0.4 mM en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.0 a una temperatura de 25° C, para un volumen total de 1.5 ml; el tiempo de incubación de acuerdo al ensayo. En la gráfica IV.8 se muestra el curso normal de la peroxidación microsomal dependiente de NADPH + H^+ con respecto al tiempo; en ausencia de NADPH la concentración de malonaldehído permanece cercana a cero.

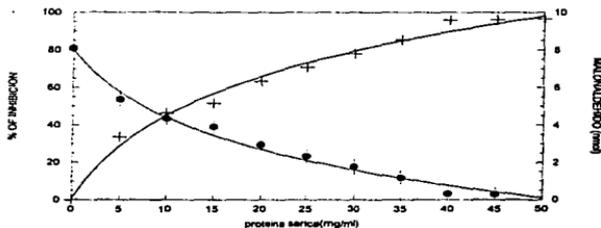
La reacción se interrumpió al adicionar 500 μl de ácido tricloroacético al 35 %. A la solución resultante le fué adicionado 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0.375 % en HCl 0.2 N y fué puesta en ebullición por 15 minutos. Las muestras se enfriaron en hielo y su absorbancia se midió a 535 nm. (Hicks and Medina-Navarro, 1995).





Gráfica IV.8

Bajo las condiciones antes descritas se estableció la inhibición del sistema por diferentes alícuotas de suero sanguíneo humano, como se muestra en la gráfica IV.9. En la línea con (+) se muestra el porcentaje de inhibición de varias alícuotas de suero; 0% representa el porcentaje de inhibición sin la adición de suero, y se demuestra que se requieren aproximadamente 40 miligramos por mililitro de suero para lograr cerca del 100 % de inhibición. En la línea con (•) se presentan las concentraciones de malonaldehído; 8.09 nmol representa su concentración antes de la adición de suero sanguíneo. La cantidad de proteína microsomal fué de 1.5 mg/ml y 0.4 mM de NADPH como en los ensayos previos y el tiempo de incubación fué de 60 minutos; se trata del promedio de seis experimentos \pm D.E.



Gráfica IV.9

EVALUACION ESTADISTICA.

Se trabajó con variables numéricas continuas, por lo cual, de acuerdo a los ensayos de normalidad (Kolgomorov-Smirnov) se eligieron las pruebas paramétricas ANOVA y prueba "t" de student y las libres de distribución Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Los resultados se evaluaron con la prueba de Dunn para las paramétricas y Bonferroni para las no paramétricas. Se utilizó el programa estadístico Sigma Stat for Windows, ver. 1, 1992-1994, Jandel Corporation.

HIPOTESIS

$$H_0 : X = X$$

$$H_1 : X \neq X$$

normalidad

Prueba "t" de
Student
no pareada
intergrupos
(2 grupos)

ANOVA
intergrupos
(3 grupos)
un solo factor
sin replicación.

Bonferroni

no normalidad

$$X_0: D_A = D_B$$

$$X_1: D_A \neq D_B$$

Mann-Whitney

Kruskal-Wallis

Dunn

V. RESULTADOS.

Fueron considerados significativamente diferentes solamente los resultados que presentaron una $P < 0.05$ tanto en la prueba "t" de student como en el caso de ANOVA, Kruskal Wallis y Mann-Withney.

Al comparar al grupo B, o de breve estancia en la Ciudad de México (8 días), con el grupo control, esto es, de personas que nunca han vivido en la Ciudad de México o la han visitado en los últimos 10 años, solo se encontró diferencia significativa al cuantificar la concentración de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico, $P = 0.01$ y $P = 0.002$, "t" y Kruskal-Wallis respectivamente (Tabla V.13).

Al comparar el grupo C, de personas que han vivido en la Ciudad de México durante los últimos 20 años, con el grupo control, se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de cromolípidos fluorescentes ($P < 0.001$ Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) entre los productos de peroxidación, y en el caso de la Capacidad Antioxidante del suero ($P < 0.001$ "t" y ANOVA) (Tabla V.13)

Al comparar los grupos de fumadores y no fumadores se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de dienos conjugados ($P = 0.01$ "t" y ANOVA), cromolípidos fluorescentes ($P = 0.001$ "t" y ANOVA), y en la capacidad antioxidante del suero ($P = 0.004$ Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) (Tabla V.14).

A continuación se presentan los datos generales de los grupos estudiados para cada una de las variables, así como las tablas donde se resumen los resultados del análisis estadístico que se llevó a cabo de acuerdo al esquema presentado en la parte final de material y métodos.

Tabla VI VALORES INDIVIDUALES PARA CADA VARIABLE ESTANCIA EN LA CIUDAD DE MEXICO

RabA	RabB	RabC	Denos A	Denos B	Denos C	Cromo A	Cromo B	Cromo C	SOD A	SOD B	SOD C	CAS A	CAS B	CAS C
8.00	5.83	5.30	8.14	5.00	4.91	37.00	26.00	34.00	71.38	161.97	26.71	52.36	47.08	57.34
5.83	8.81	6.51	5.00	7.38	4.83	27.00	22.00	28.00	175.20	88.42	36.57	45.25	56.20	58.10
7.04	8.00	7.91	6.95	8.14	8.52	35.00	30.00	38.00	174.10	71.38	80.48	51.57	53.16	53.54
5.72	4.90	6.19	4.29	5.25	3.92	43.00	22.00	36.00	62.76	52.03	103.51	48.02	48.10	56.58
5.37	4.61	5.47	6.05	6.58	4.16	33.00	31.00	35.00	78.82	196.27	74.83	52.77	55.18	55.31
5.45	6.73	4.70	6.69	4.37	6.48	31.00	22.00	36.00	89.45	76.58	34.31	55.55	55.18	52.63
5.30	6.26	3.50	4.91	4.97	4.72	30.00	26.00	35.00	78.38	70.35	127.62	54.66	57.46	51.13
7.91	7.31	4.18	7.10	5.47	7.38	27.00	34.00	39.00	182.10	96.97	84.85	56.16	53.92	63.92
4.08	5.70	2.77	7.40	4.24	5.93	26.00	24.00	37.00	40.05	63.60	46.58	54.30	53.41	54.17
5.33	7.21	5.33	3.57	4.65	3.52	37.00	26.00	33.00	24.34	132.98	100.82	54.07	52.53	56.70
2.91	4.82	3.01	5.70	6.20	5.70	24.00	28.00	38.00	62.39	73.66	78.38	49.32	56.07	54.93
6.15	7.14	1.47	6.88	3.42	7.24	35.00	34.00	39.00	75.13	214.75	185.77	53.07	53.29	55.69
5.83	7.73	2.64	6.85	3.84	7.59	26.00	33.00	28.00	95.27	63.60	55.99	46.70	52.15	57.14
5.23	6.74	2.00	5.10	4.19	5.29	25.00	39.00	34.00	49.68	79.15	49.68	49.80	58.81	53.48
5.53	5.91	3.53	4.92	4.43	5.95	33.00	34.00	33.00	34.10	184.10	75.55	50.10	50.41	58.14
6.15	3.88	1.14	5.23	4.46	4.99	23.00	34.00	35.00	75.50	79.72	78.61	50.40	50.26	52.72
4.18	5.50	3.07	6.24	5.12	3.91	30.00	32.00	39.00	60.40	134.33	38.96	46.20	58.07	63.84
7.99	6.04	2.80	4.50	5.88	5.04	25.00	34.00	38.00	75.30	112.70	93.50	49.80	53.92	50.35
3.41	3.41	6.53	5.17	5.17	6.38	28.00	36.00	38.00	88.64	171.31	61.29	53.16	55.18	55.15
4.53	5.81	3.23	6.46	6.25	4.90	26.00	34.00	36.00	103.90	88.64	112.73	54.17	51.53	53.81
4.82	5.58	6.20	6.61	6.61	30.00	30.00	38.00	73.66	88.75	92.32	51.26	53.33	57.78	
5.61	5.34	4.25	7.33	28.00	35.00	57.03	35.00	57.03	41.85	52.65	50.33	54.64		
4.86	4.70	4.30	5.35	32.00	37.00	96.68	37.00	96.68	61.35	51.39	56.82			
4.90	7.70	4.00	5.98	22.00	36.00	52.03	36.00	52.03	50.47	55.31	55.99			
4.05		4.05		34.00		88.08		88.08		51.89				
3.01		4.00		23.00		89.33		89.33		54.05				
4.94		5.29		26.00		50.78		50.78		53.16				
4.82		5.12		24.00		97.98		97.98		53.40				
4.65		5.35		31.00		50.63		50.63		53.41				
4.78		4.23		25.00		53.43		53.43		48.10				
4.49		4.21		23.00		102.80		102.80		54.81				
4.41		5.23		30.00		83.64		83.64		56.30				
4.14		5.32		21.00		85.92		85.92		55.54				
5.14		4.01		27.00		70.24		70.24		55.70				
5.60		5.17		21.00		104.90		104.90		53.54				
										53.92				
										53.41				
										52.51				
										53.15				
										56.30				
										58.42				

Rab= Reactivos al ácido
 tobutanolico
 Crmo= Cromolípidos
 SOD=Superóxido dismutasa
 CAS=Capacidad antioxidante
 del suero

Tabla V 2 VALORES INDIVIDUALES PARA CADA VARIABLE FUMADORES Y NO FUMADORES

Razb A	Razb B	Razb C	Denos A	Denos B	Denos C	Cromo A	Cromo B	Cromo C	SODA	SOD B	SOD C	CASA	CAS B	CAS C
8.00	5.83	5.30	8.14	5.00	4.91	37.00	26.00	34.00	71.38	161.97	26.71	52.36	47.08	57.34
5.83	6.61	6.51	5.00	7.38	4.83	27.00	22.00	28.00	175.20	88.42	36.57	48.25	56.20	58.10
7.04	8.00	7.91	6.95	8.14	8.52	35.00	30.00	38.00	174.10	71.38	80.48	51.57	53.16	53.54
5.72	4.90	6.19	4.29	5.25	3.82	40.00	22.00	36.00	62.76	52.03	103.51	49.02	48.10	56.58
5.37	4.61	5.47	6.05	6.58	4.16	33.00	31.00	35.00	78.82	196.27	74.83	52.77	55.18	55.31
5.45	6.73	4.70	6.69	4.37	6.48	31.00	22.00	36.00	89.45	70.58	34.31	55.55	55.19	52.65
5.30	6.26	3.50	4.91	4.97	4.72	30.00	26.00	35.00	78.38	70.35	127.62	54.85	57.46	51.13
7.91	7.31	4.18	7.10	5.47	7.38	27.00	34.00	38.00	182.10	96.97	84.85	56.16	63.92	63.62
4.08	5.70	2.77	7.40	4.24	5.93	26.03	24.00	37.00	40.05	63.60	46.58	54.30	53.41	54.17
5.33	7.21	5.33	3.52	4.85	3.52	37.00	26.00	33.00	24.34	132.98	130.82	54.07	62.53	56.70
2.91	4.82	3.01	5.70	8.20	5.70	24.00	28.00	38.00	62.39	73.66	78.38	49.32	56.07	54.93
6.15	7.14	1.47	6.88	3.42	7.24	35.00	34.00	38.00	75.13	214.75	185.77	53.07	53.29	53.69
5.83	7.73	2.64	6.85	3.84	7.39	26.30	33.00	28.00	95.27	63.80	55.99	46.70	52.15	57.14
5.23	6.74	2.00	5.10	4.19	5.29	25.00	38.00	34.00	49.68	79.15	49.68	49.80	58.81	53.48
5.53	5.91	3.53	4.92	4.43	5.95	33.00	34.00	33.00	34.10	184.10	75.55	50.10	53.41	58.14
6.15	3.88	1.14	5.23	4.46	4.99	23.00	34.00	35.00	75.50	79.72	78.61	50.40	50.26	52.72
4.18	5.50	3.07	6.24	5.12	3.91	30.00	32.00	39.00	60.40	134.33	38.96	46.20	58.07	63.84
7.99	6.04	2.80	4.50	5.88	5.04	25.00	34.00	38.00	75.30	112.70	93.50	49.60	53.92	50.35
3.41	3.41	6.53	5.17	5.17	6.38	28.00	36.00	38.00	88.64	171.31	61.29	53.16	55.18	53.15
4.53	5.61	3.23	6.46	6.25	4.90	26.00	34.00	36.00	103.90	88.64	112.73	54.17	51.53	53.81
4.82		5.58	6.20		6.61	30.00		36.00	73.66	88.75	92.32	51.26	53.33	57.78
5.61		5.34	4.25		7.33	28.00		35.00	57.03		41.85	52.65	50.33	54.64
4.86		4.70	4.30		5.35	32.00		37.00	96.68		61.35	51.38		56.82
4.90		7.70	4.00		5.98	22.00		36.00	52.03		50.47	56.31		55.99
4.05			4.05			34.00			88.08			51.89		
3.01			4.00			23.00			83.33			54.05		
4.94			5.29			26.00			50.78			53.16		
4.82			5.12			24.00			97.58			53.40		
4.65			5.35			31.00			50.63			53.41		
4.78			4.23			25.00			59.43			48.10		
4.49			4.21			23.00			102.60			54.81		
4.41			5.23			30.00			88.64			56.30		
4.14			5.32			21.00			85.92			55.54		
5.14			4.01			27.00			70.24			55.70		
5.60			5.17			21.00			104.90			53.54		
												53.92		
												53.41		
												52.51		
												53.15		
												56.30		
												58.42		

Razb= Reactivos al dioxo
 tobarrónico
 Cromo= Cromolpidos
 SOD=Superóxido de molasa
 CAS=Ceposido antioxidante
 celuloso

DATOS GENERALES DE LOS GRUPOS DE ESTANCIA EN LA CIUDAD DE MEXICO PARA CADA VARIABLE.

PRODUCTOS REACTIVOS AL ACIDO TIOBARBITURICO

Tabla V.3

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
A	35	5.2	5.14	1.22	0.206
B	20	6.11	5.97	1.39	0.310
C	24	4.36	4.44	1.87	0.382

DIENOS CONJUGADOS

Tabla V.4

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
A	35	5.37	5.17	1.15	0.195
B	20	5.26	5.06	1.19	0.232
C	24	5.68	5.53	1.29	0.264

CROMOLIPIDOS FLUORESCENTES

Tabla V.5

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
A	35	28.43	27.00	4.91	0.830
B	20	30.00	31.5	5.08	1.136
C	24	35.58	36.00	2.93	0.599

SUPEROXIDO DISMUTASA

Tabla V.6

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
A	35	81.86	75.50	35.82	6.055
B	21	109.89	88.64	49.02	10.69
C	24	74.70	75.19	35.74	7.29

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUERO

Tabla V.7

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
A	41	52.65	53.16	2.79	0.436
B	22	53.57	53.41	2.97	0.633
C	24	55.83	55.50	3.25	0.663

DATOS GENERALES DE LOS GRUPOS DE FUMADORES Y NO FUMADORES PARA CADA VARIABLE.

PRODUCTOS REACTIVOS AL ACIDO TIOBARBITURICO

Tabla V. 8

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FUMADORES	23	5.79	6.18	1.48	0.309
NO FUMADORES	35	5.20	5.14	1.22	0.206

DIENOS CONJUGADOS

Tabla V. 9

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FUMADORES	24	6.24	6.42	1.47	0.301
NO FUMADORES	35	5.37	5.17	1.15	0.195

CROMOLIPIDOS FLUORESCENTES

Tabla V. 10

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FUMADORES	24	34.75	35.0	5.21	0.969
NO FUMADORES	35	28.43	27.0	4.91	0.830

SUPEROXIDO DISMUTASA

Tabla V. 11

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FUMADORES	25	83.57	86.46	46.83	9.360
NO FUMADORES	35	90.41	85.50	43.56	6.055

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUERO

Tabla V. 12

GRUPO	TAMAÑO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FUMADORES	18	56.28	56.20	4.72	1.113
NO FUMADORES	41	52.65	53.16	2.79	0.436

Tabla V.13. ANALISIS ESTADISTICO. ESTANCIA EN LA CIUDAD DE MEXICO

	T ² de Student	Mann Whitney	ANOVA	Kruskal Wallis	Dunn	Bonferroni
Reactivos al atb A vs B	✓ P=0.01			✓ P=0.002	✓ P=0.05	
Reactivos al atb A vs C	P>0.05		P>0.05			
Dienes conjugados A vs B	P>0.05		P>0.05			
Dienes conjugados A vs C	P>0.05		P>0.05			
Cromolípidos A vs B	P>0.05		P>0.05			
Cromolípidos A vs C		✓ P<0.001		✓ P<0.001	✓ P<0.05	
Superóxido dismutasa A vs B		✓ P=0.03		P>0.05		
Superóxido dismutasa A vs C		P>0.05		P>0.05		
Capacidad antioxidante del suero A vs B	P>0.05		P>0.05			
Capacidad antioxidante del suero A vs C	✓ P<0.001		✓ P<0.001			✓ P<0.05

A= Grupo control: personas que nunca han vivido en la Ciudad de México o la han visitado en los últimos 10 años.

B= Grupo de las personas cuya estancia en la Ciudad de México es de 8 días.

C= Grupo de personas que han vivido en la Ciudad de México durante los últimos 20 años.

Tabla V.14 ANALISIS ESTADISTICO. FUMADORES Y NO FUMADORES.

	T- de Student	Mann-Whitney	ANCOVA	Kruskal-Wallis	Dunn	Bonferroni
Reactivos al ácido tiobarbitúrico F vs NF	P>0.05		P>0.05			
Dienes conjugados F vs NF	✓ P=0.01		✓ P=0.01			✓ P<0.05
Cromolípidos F vs NF	✓ P=0.001		✓ P=0.001			✓ P<0.05
Superóxido dismutasa F vs NF		P>0.05		P>0.05		
Capacidad antioxidante del suero F vs NF		✓ P=0.004		✓ P=0.004	✓ P<0.05	

F=Fumadores; NF=No fumadores

VI. DISCUSION.

Las especies reactivas del oxígeno pueden generarse de forma endógena a partir de reacciones metabólicas de oxidación, por ejemplo a través de la actividad de ciertas oxidasas o bien, por la acción de componentes del humo del tabaco y contaminantes atmosféricos, e indirectamente por el metabolismo de solventes, drogas y pesticidas (Machlin and Bendich, 1987).

Las reacciones del ozono y aun las del NO_2 con las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados ya se conocía (Thomas et al, 1958). El ozono no es un radical, pero puede oxidar moléculas biológicas directamente o bien reaccionar en soluciones acuosas alcalinas y producir OH^{\bullet} (Glaze, 1986; Mustafa, 1990). Se han podido identificar ozónidos secundarios derivados de la acción del ozono con componentes del surfactante pulmonar (Lai et al, 1990). El ozono puede generar peroxidación al formar radicales libres (Hoigne and Bader, 1975). El aire de la Ciudad de México contiene altas concentraciones de ozono (Bravo y Torres, 1978; Bravo et al, 1993).

Se desconoce la dimensión del daño a la salud de los individuos expuestos a ambientes contaminados y resulta extremadamente difícil de valorar. Sin embargo, la cuantificación de los productos de peroxidación y de la capacidad antioxidante del suero, es una aproximación que consideramos razonable. Se ha reportado un aumento en los niveles de productos de peroxidación en el plasma sanguíneo de fumadores (Pré et al., 1988, 1990) (cromolípidos, pero no reactivos al tiobarbitúrico), lo que probablemente se deba a la cantidad de radicales libres en el humo del cigarrillo (Slater, 1984). En el presente estudio, se reportan incrementos en la concentración de dienos conjugados ($P < 0.05$) y de cromolípidos fluorescentes ($P < 0.01$) en el grupo de fumadores (Tabla V.14). Tomando como referencia estos hechos, es

posible encontrar evidencia de oxidación de algunos componentes del suero sanguíneo de individuos con distinto grado de exposición a contaminantes atmosféricos.

En el presente estudio se reportan incrementos en las concentraciones de productos de peroxidación lipídica como resultado de diferente grado de exposición a un ambiente con altas concentraciones de oxidantes fotoquímicos (productos reactivos al ácido tiobarbitúrico en el grupo B y cromolípidos fluorescentes en el grupo C, Tabla V.13). Previamente se ha propuesto que el efecto del ozono y el bióxido de nitrógeno se relacionan con sus efectos oxidativos incluyendo la iniciación de la peroxidación lipídica (Thomas et al., 1969; Goldstein et al, 1970; Roehm, et al., 1971; Chow and Tappel, 1972). Resulta notable que se encuentran diferencias en cuanto al tipo de producto de peroxidación respecto al tiempo de exposición de los grupos estudiados. Es importante recordar que, mientras el malonaldehído (MDA) es un producto secundario de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, los compuestos fluorescentes o cromolípidos son aparentemente el producto de la reacción del MDA con aminoácidos formando bases conjugadas de Schiff, lo que se ha podido comprobar *in vitro*. Ciertos pigmentos fluorescentes de lipofuccina podrían ser las bases de Schiff del MDA (Tappel, 1973; Fletcher et al., 1973). Se ha propuesto que dichos pigmentos, que suelen acumularse en el interior de algunas células, están relacionadas al envejecimiento (Jain and Hochtein, 1980). La acumulación de estos compuestos podría explicar su incremento en el grupo con más alto grado de exposición (grupo C) (Tabla V.13); es importante comparar este parámetro con el de fumadores (tiempo prolongado de exposición a oxidantes) (Tabla V.14).

Debido a que los mecanismos de defensa contra el daño celular involucran la respuesta de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, el incremento en la actividad de superóxido dismutasa en los individuos del grupo B ($P=0.03$ solo para "t" de student) podría representar una respuesta antioxidante inmediata ante la presencia de ciertos contaminantes atmosféricos. Se ha reportado un incremento en la actividad de las superóxido dismutasas (Cu, Zn y Mn) en pulmón de rata luego de la exposición a ozono (Dubick and Keen, 1983; Dubick et al., 1988; Iqbal and Whitney, 1991). Sin embargo no se puede descartar la

posibilidad de que el $O_2^{\cdot -}$ liberado por las células de respuesta inflamatoria durante la fagocitosis de los débris del tejido dañado por el O_3 , fuera el inductor de la SOD Otra posibilidad es la inducción de la enzima por alguno o algunos de los productos de peroxidación o por corticosteroides (Randahawa et al.,1986) liberados como respuesta a la tensión oxidativa (Marklund,1984).

Dada la diversidad de las defensas antioxidantes específicas contra el daño generado por los radicales libres, en el presente estudio se valoró la capacidad antioxidante del suero (CAS) para inhibir la lipoperoxidación en sistema microsomal de la rata, valorada como la concentración de malonaldehído producido bajo la acción de un sistema controlado ADP/NADPH + H^+/Fe^{3+} , (Hicks and Medina-Navarro, 1995). La acción antioxidante de la superóxido dismutasa queda excluida del parámetro, porque se sabe que el anión superóxido no interviene en la inhibición de la lipoperoxidación en el sistema citado (Koster and Slee, 1980). Esta es la razón por la que la superóxido dismutasa se valora en el presente estudio de forma independiente.

Se presentaron diferencias significativas entre el grupo C de residentes permanentes con el grupo control para la Capacidad Antioxidante del Suero (Tabla V.14), en los grupos de estancia en la Ciudad de México. Un incremento en el porcentaje de inhibición para el grupo de residentes permanentes corresponde a una respuesta tardía de las moléculas antioxidantes que intervienen en dicha inhibición, al igual que el discreto aumento mostrado en la actividad de la superóxido dismutasa parece representar una respuesta temprana. Se ha podido comprobar la liberación de antioxidantes como vitamina E en respuesta a la inhalación de ozono (Rohem et al., 1972; Pryor, 1991).

La respuesta antioxidante en el caso de los grupos de fumadores y no fumadores mostró un incremento en la capacidad antioxidante del suero se presentó en el grupo de los fumadores, mientras que para el caso de la superóxido dismutasa no se encontró diferencia significativa. La presencia de radicales libres en el humo del cigarrillo se traduce en una peroxidación lipídica (Tabla V.14); ante el estímulo oxidativo, el suero de los individuos fumadores

responde con un incremento en la capacidad antioxidante del suero (CAS). En la figura 34 se muestra un esquema general de la interpretación de los resultados obtenidos.

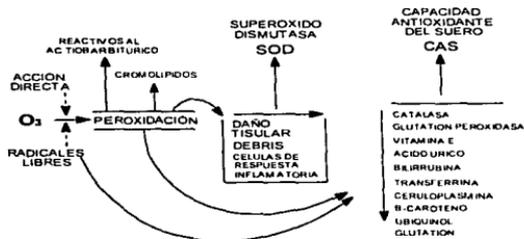


Figura 34

En síntesis, la presencia de especies de oxígeno reactivas genera peroxidación, que se traduce en un incremento (primario) de superóxido dismutasa, posiblemente por la presencia de las células de la respuesta inflamatoria (estallido respiratorio) y de productos de peroxidación tempranos (reactivos al tiobarbitúrico); posteriormente, en una segunda etapa la liberación de antioxidantes se incrementa (CAS) e igualmente la de otros productos de peroxidación como cromolipidos, coincidiendo con el patrón general para fumadores.

El grado de significancia de las pruebas estadísticas se fijó de tal forma que se cumpliera con la premisa de que sólo el 5% de los datos a favor de la hipótesis alternativa (una diferencia real entre dos grupos de datos) pudieran ser producto del azar. Este aspecto es importante, dado que significa que, de cada 100 individuos estudiados para una variable en particular, se puede estar equivocado en 5 de los valores estimados; es decir, que existen buenas posibilidades de equivocarnos para cualquiera de las variables medidas en el presente trabajo. Otra información importante, que debe tenerse en cuenta, es el pequeño margen que puede existir entre las variables del presente estudio; por ejemplo:

a) la posibilidad de cometer errores en la selección de las muestras. Si bien las pruebas estadísticas contemplan teóricamente la posibilidad de "sesgos" no considerados, el número o bien la magnitud de los mismos puede sobrepasar lo estimado. Por ejemplo, uno de los criterios de inclusión supone que se trata de muestras de residentes de algunas ciudades de la provincia con por lo menos 10 años de no visitar la ciudad de México y no fumadores. Lógicamente, se puede estar subestimando la posibilidad de que algunos de los sujetos estudiados se encontraran expuestos a algún tipo de contaminación local no contemplada. Otro tipo de sesgo podría encontrarse al considerar las múltiples variables a las que seguramente estuvieron expuestos los sujetos que vivieron en esta ciudad por mas de veinte años y en todos los grupos en el transcurso de la investigación.

b) La naturaleza de los procedimientos. Uno de los procedimientos para determinar los productos de peroxidación, eso es, el que mide los productos reactivos al ácido tiobarbitúrico ha sido cuestionado en varias ocasiones por la posibilidad de presentar interferencia con algunas moléculas orgánicas como la hemoglobina y el ácido úrico, así como por la posibilidad de que se forme malonaldehído en el transcurso del procedimiento. Aún tratándose de una prueba ampliamente utilizada como índice de peroxidación (Lepage et al., 1984), se debe tomar en cuenta la posibilidad de la influencia de estos factores en los resultados.

El hecho de que de los tres productos de peroxidación estudiados, algunos tengan diferencias al grado de significancia estadística para un grupo de estancia y otros no, plantea la necesidad de cuestionar el significado de los resultados obtenidos. En las investigaciones futuras se habrá de tomar en cuenta la posibilidad de modificar el enfoque metodológico si se pretende demostrar que el grado de exposición a la contaminación del aire presente en la Ciudad de México es directamente proporcional al grado de peroxidación lipídica del suero sanguíneo humano de los individuos expuestos.

En el análisis estadístico realizado se definieron las variables como numéricas y continuas, por lo que se procedió a realizar un contraste estadístico y a establecer las hipótesis de trabajo referentes a las variables estudiadas (que existen diferencias entre los resultados en el

caso de la hipótesis alternativa). Cuando los supuestos para las pruebas estadísticas utilizadas se cumplieron, es decir, el caso de la normalidad y la varianza, se utilizaron las pruebas paramétricas "t" de student y el análisis de varianza. En el caso contrario, se recurrió a las técnicas alternativas no paramétricas de Mann-Witney y Kruskal Wallis. La justificación de su uso radica en que, respecto a un criterio matemático de eficiencia estadística, las pruebas no paramétricas son al menos iguales o superiores a las paramétricas. En realidad se podría esperar *a priori* resultados similares entre las pruebas paramétricas y no paramétricas si tomamos en cuenta que para 25 muestras aleatorias e independientes, una prueba paramétrica como "t" de Student, no se ve afectada relativamente por infracciones a los supuestos de normalidad y varianza de la distribución (Edwards, 1973). En términos generales, las pruebas de ANOVA y su contraparte no paramétrica son pruebas más exigentes, es decir, más eficientes desde el punto de vista estadístico. Esta debe ser la causa de la diferencia en los resultados entre las dos pruebas no paramétricas utilizadas en el caso de superóxido dismutasa entre los grupos A y B. La eficiencia de una prueba estadística se asocia a la probabilidad de que rechace la hipótesis nula cuando ésta sea realmente falsa, es decir, la eficiencia es 1 menos la probabilidad de cometer un error tipo II, o sea $1-\beta$ (Bradley, 1968). Esto significa que, tomando en cuenta la eficiencia estadística de las pruebas empleadas en el presente estudio, no debe existir diferencia significativa para el caso de la superóxido dismutasa para un nivel de significancia de 5%.

VII. CONCLUSIONES.

1. Existe una relación entre la exposición de grupos de individuos sanos, no fumadores, a la contaminación ambiental prevaleciente en la Ciudad de México y cambios bioquímicos en el suero sanguíneo proveniente de su sangre. Dichos cambios se encontraron en los niveles de dos productos de peroxidación cuantificados. Estos mismos cambios se encontraron en los individuos fumadores. Sin embargo, no es posible asegurar en forma definitiva que existe una relación proporcional entre el tiempo de exposición a la contaminación prevaleciente en la Ciudad de México y los niveles altos de productos de peroxidación medidos con las técnicas descritas.

2. Se detectan diferencias significativas al comparar la capacidad antioxidante del suero en un grupo de individuos con más de veinte años de vivir en la Ciudad de México al ser comparadas con un grupo control. También se encontraron diferencias en este parámetro al comparar individuos fumadores y no fumadores.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Acuña-L. Salud ambiental. Ed Siglo XXI. México. 1987. pp. 23-24.
- Amdur-MA, Air pollutants. In, Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of Poisons, 3rd ed.(Klessen CD, Amdur MO. and Doulls J. eds.) Macmillan Pub. Co. New York. 1985. pp. 801-824
- Ames-BN; Cathcart-R; Schwiers-E; Hochstein-P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 1981 Nov; 78(11): 6858-62
- Anders-C. Interview: "The effects are present". *México Journal*. 1988 Vol II(2): 3-4
- Bradley-JV. Distribution-free statistical test. Englewood Cliffs, NJ :Prentice-Hall, USA, 1968. pp 79-81
- Bravo-HA. , Perrin-FG. , Sosa-RE. y Torres-JR. La contaminación del aire en la Ciudad de México *Boletín Geos*. 1987, 7(1): 3-9
- Bravo-HA. , Sosa-FR. y Torres-JR. Ozono y lluvia ácida en la Ciudad de México *Ciencias* 1991, 22:33-40
- Bravo-HA. , Roy-Ocotla-RG. , Sanchez-AP. y Torres-JR. La contaminación atmosférica por ozono en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (IX). *Comisión Nacional de Derechos Humanos*. 1992. México.
- Bravo-AH. , Sosa-ER. , Roy-Ocotla-RG. y Sanchez-AP. Presentation at the 86th Annual Meeting and Exhibition . Denver, Colorado June 13-18 1993
- Barber-AA; Bernheim-F.Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv-Gerontol-Res*. 1967; 2: 355-403
- Beauchamp-C; Fridovich-I Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal-Biochem*. 1971 Nov; 44(1): 276-87
- Benedetto-C; Bocci-A, Dianzani-MU; Ghiringhelo-B; Slater-TF; Tomasi-A; Vannini-V. Electron spin resonance studies on normal human uterus and cervix and on benign and malignant uterine tumors. *Cancer-Res*. 1981 Jul, 41(7): 2936-42
- Bird-RP; Draper-HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods-Enzymol*. 1984; 105: 299-305

Bird-RP; Hung-SS; Hadley-M; Draper-HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Anal-Biochem.* 1983 Jan; 128(1): 240-4

Boveris-A; Chance-B; Filipkowski-M; Nakase-Y; Paul-KG. Organ chemiluminescence: non-invasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77: 347-351

Brawn-K; Fridovich-I. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch-Biochem-Biophys.* 1981 Feb; 206(2): 414-9

Chan-HW; Levett-G. Autoxidation of methyl linoleate. Separation and analysis of isomeric mixtures of methyl linoleate hydroperoxides and methyl hydroxylinoleates. *Lipids.* 1977 Jan, 12(1): 99-104

Chio-KS and Tappel-AL. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* 1969, Vol 8(7): 2821-27

Chow-CK. Biochemical responses in lungs of ozone-tolerant rats. *Nature.* 1976 Apr 22; 260(5553): 721-2

Chow-CK. and Tappel-AL. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lung of ozone exposed rats. *Lipids* 1977, 7/8:518-525

Collipp-PJ; Patrick-JR; Gilchrist-GS; Donnell-GN; Brubaker-C. Liver glucose-6-phosphatase and carbohydrate metabolism in childhood leukemia. *Pediatr-Res.* 1967 Mar; 1(2): 116-21

Cross-CE; Motchnik-PA; Bruener-BA; Jones-DA; Kaur-H; Ames-BN; Halliwell-B. Oxidative damage to plasma constituents by ozone. *FEBS-Lett.* 1992 Feb 24; 298(2-3): 269-72

Dennis-KJ; Shibamoto-T. TIGAS chromatographic determination of malonaldehyde formed by lipid peroxidation. *Free-Radic-Biol-Med.* 1989; 7(2): 187-92

Devlin-RB; McDonnell-WF; Mann-R; Becker-S; House-DE; Schreinemachers-D; Koren-HS Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol.* 1991 Jan; 4(1): 72-81

Dillard-CJ; Tappel-AL; Fletcher-BL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal-Biochem.* 1973 Mar; 52(1): 1-9

Diplock-A. Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice Evans and RH. Burdon (Eds). *Free Radical Damage and its Control*. 1994, Elsevier Science B.V. Amsterdam Netherlands.

Dubick-MA; Keen-CL. Tissue trace elements and lung superoxide dismutase activity in mice exposed to ozone. *Toxicol-Lett.* 1983 Jul; 17(3-4): 355-60

Dubick-MA; Zidenberg-Cherr-S; Rucker-RB; Keen-CL. Superoxide dismutase activity in lung from copper- and manganese-deficient mice exposed to ozone. *Toxicol-Lett.* 1988 Aug; 42(2): 149-57

Edwards-AL. Statistical Methods. 3d de. New Edwards AL. Statistical Methods, 3d de. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1973. pp. 46-57

Eilers-RJ. Notification of final adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry: specifications for preparation of standard solution. *Am J Clin Pathol* 1967;47:212

Esterbauer-H; Koller-E; Slez-EG; Koster-JF. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochem-J.* 1986 Oct 15; 239(2): 405-9

Ewing-JC; Cosgrove-JP; Giamalva-DH; Church-DF; Pryor-WA. Autoxidation of methyl linoleate initiated by the ozonide of allylbenzene. *Lipids.* 1989 Jul; 24(7): 609-15

Fletcher-LB., Dullard-JC. and Tappel-LA. Fluorescent product relevant to aging pigments. *Anal Biochem* 1973;52:1-9

Freeman-BA; Crapo-JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab-Invest.* 1982 Nov; 47(5): 412-26

Frei-B; Forte-TM; Ames-BN; Cross-CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem-J.* 1991 Jul 1; 277 (Pt 1): 133-8

Fridovich-I. Overview: biological sources of O₂. *Methods-Enzymol.* 1984; 105: 59-61

Fridovich-I; Freeman-B. Antioxidant defenses in the lung. *Annu-Rev-Physiol.* 1986; 48: 693-702

Gebecki-JM; Hicks-M. Fatty acid vesiculation. *Chem Phys Lipid* 1976, 16: 142-160

Glaze-WH. Reaction products of ozone: a review. *Environ Health Perspect.* 1986; 69: 151-157

Goldstein-BD; Balchum-OJ. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc-Soc-Exp Biol- Med.* 1967 Nov; 126(2): 356-8.-

Goldstein-BD; Buckley-RD; Cadenas-R; Balchum-OJ. Ozone and vitamin E. *Science*. 1970 Aug 7; 169(945): 605-6

Grinna-LS; Barber-AA. Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities. *Biochim-Biophys-Acta*. 1972 Nov 2; 288(2): 347-5

Gutteridge-J. Caeruloplasmin: a plasma protein, enzyme, and antioxidant. *Ann-Clin-Biochem*. 1978 Nov; 15(6): 293-6

Halliwell-B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am-J-Med*. 1991 Sep 30; 91(3C): 14S-22S

Halliwell-B. Production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals by phagocytic cells: a cause of chronic inflammatory disease?. *Cell-Biol-Int-Rep*. 1982 Jun; 6(6): 529-42

Halliwell-B; Gutteridge-JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch-Biochem-Biophys*. 1986 May 1; 246(2): 501-14

Halliwell-B; Gutteridge-JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem-J*. 1984 Apr 1; 219(1): 1-14

Halliwell-B; Gutteridge-JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods-Enzymol*. 1990; 186: 1-85

Heath-RL; Tappel-AL. A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal-Biochem*. 1976 Nov; 76(1): 184-91

Hicks-JJ; Medina-Navarro-R. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. *Arch-Med-Res*. 1995 Summer; 26(2): 169-72

Hicks-JJ; Medina-Navarro-R; Guzman-Grenfell-A; Wachter-N; Lifshitz-A. Possible effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and serum lipoperoxides in the human adult. *Arch-Med-Res*. 1996 Summer; 27(2): 145-9

Hicks-M; Delbridge-L; Yue-DK; Reeve-TS. Catalysis of lipid peroxidation by glucose and glycosylated collagen. *Biochem-Biophys-Res-Commun*. 1988 Mar 15; 151(2): 649-55

Hicks M ; Gebicki JM. Iodometric hydroperoxide determination. *Anal Biochem* 1979, 99: 249-51

Hoigne-JK; Barder-H. Ozonation of water: role of hydroxyl radical as oxidizing intermediates. *Science* 1975, 1990: 782-784

Holtzman-MJ; Cunningham-JH; Sheller-JR; Irsigler-GB; Nadel-JA; Boushey-HA. Effect of ozone on bronchial reactivity in atopic and nonatopic subjects. *Am-Rev-Respir-Dis.* 1979 Nov; 120(5): 1059-67

Horstman-DH; Folinsbee-LJ; Ives-PJ; Abdul-Salaam-S; McDonnell-WF. Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6 6-hour exposures with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 ppm. *Am-Rev-Respir-Dis.* 1990 Nov; 142(5): 1158-63

Hubbard-RC; Ogushi-F; Fells-GA; Cantin-AM; Jallat-S; Courtney-M; Crystal-RG. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J-Clin-Invest.* 1987 Nov; 80(5): 1289-95

Hunninghake-GW; Crystal-RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am-Rev-Respir-Dis.* 1983 Nov; 128(5):

Jain-SK. and Hochtein P. Polymerization of membrane components in aging red blood cells *Biochem Biophys Res Commun* 1980, 92:247-254

Kappus-H. In Oxidative stress. (Ed. Sies) Academic Press. London 1985. pp 284-290.

Kehrl-HR; Vincent-LM; Kowalsky-RJ; Horstman-DH; O'Neil-JJ; McCartney-WH; Bromberg-PA. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am-Rev-Respir-Dis.* 1987 May; 135(5): 1124-8

Kennedy-CH; Hatch-GE; Slade-R; Mason-RP. Application of EPR spin-trapping technique to the detection of radicals produced in vivo during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 19: 935-40

King-MM; Lai EK; Mc Cay-PB. Microsomal peroxidation. *J Biol Chem.* 1975, 250: 6496-6502

Koster-JF; Slee-RG. Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochim-Biophys-Acta.* 1980 Dec 5; 620(3): 489-99

Kreit-JW; Gross-KB; Moore-TB; Lorenzen-TJ; D'Arcy-J; Eschenbacher-WL. Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J-Apppl-Physiol.* 1989 Jan; 66(1): 217-22

- Kreut-JW., Gross-KB. and Moore TB. Neutrophils in the lung after ozone exposure. *J Appl Physiol* 1989;66: 217-222
- Lai-CC; Finlayson-Pitts-BJ; Willis-WV TI. Formation of secondary ozonides from the reaction of an unsaturated phosphatidylcholine with ozone. *Chem-Res-Toxicol*. 1990 Nov-Dec; 3(6): 517-23
- Lepage-G; Muñoz-G; Champagne-J; Roy-CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal-Biochem*. 1991 Sep 2; 197(2): 277-83
- Lowry-OH, Rosebrough-NJ., Farr-AL, and Randall-RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193:265-275
- Lunec-J; Dormandy-TL. Fluorescent lipid-peroxidation products in synovial fluid. *Clin-Sci*. 1979 Jan; 56(1): 53-9
- McCay-PB; Pfeifer-PM; Stripe-WH. Microsomal peroxidation mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1972, 303: 62-73
- Machlin-LJ; Bendich-A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB-J*. 1987 Dec; 1(6): 441-5
- Marklund-SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem-J*. 1984 Sep 15; 222(3): 649-55
- Marklund-SL; Holme-E; Hellner-L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin-Chim-Acta*. 1982 Nov 24; 126(1): 41-51
- McKnight-RC; Hunter-FE Jr. Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. II. Composition and enzymatic activity. *J-Biol-Chem*. 1966 Jun 25; 241(12): 2757-65
- Meadows-J; Smith-RC. Uracil acid protection of nucleobases from ozone-induced degradation. *Arch-Biochem-Biophys*. 1986 May 1; 246(2): 838-45
- Menzel-DB. Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. *J-Toxicol-Environ-Health*. 1984; 13(2-3): 183-204
- Menzel-DB. Toxicity of ozone, oxygen, and radiation. *Annu-Rev-Pharmacol*. 1970; 10: 379-94

Molfino-NA; Wright-SC; Katz-I; Tarlo-S; Silverman-F; McClean-PA; Szalai-JP; Raizenne-M; Slutsky-AS; Zamel-N. Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects [see comments]*Lancet*. 1991 Jul 27; 338(8761): 199-203

Morrison-RT and Boyd-RN. *Organic Chemistry*. 1980, 1ed. Allyn and Bacon, INC. NY. USA. pp.215

Murlas-CG; Roum-JH. Sequence of pathologic changes in the airway mucosa of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity. *Am-Rev-Respir-Dis*. 1985 Mar; 131(3): 314-20

Mustafa-MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free-Radic-Biol-Med*. 1990; 9(3): 245-65.

Jones-R; Mann-T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Reprod-Fertil*. 1977 Jul; 50(2): 261(1): 8833-8

Ohkawa-H; Ohishi-N; Yagi-K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction *Anal-Biochem*. 1979 Jun; 95(2): 351-8.

Ozone: too much in the wrong place [editorial] [published erratum appears in *Lancet* 1991 Aug 3;338(8762):326] [comment] *Lancet*. 1991 Jul 27; 338(8761): 221-2

Pathak-MA; Joshi-PC. Production of active oxygen species ($1O_2$ and O_2^-) by psoralens and ultraviolet radiation (320-400 nm). *Biochim-Biophys-Acta*. 1984 Mar 22; 798(1): 115-26

Poli-G; Dianzani-MU; Cheeseman-KH; Slater-TF; Lang-J; Esterbauer-H. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem-J*. 1985 Apr 15; 227(2): 629-38

Pre-J; Le Folch-A. Lipid-peroxidation products and antioxidants in plasma of cigarette smokers. *Clin Chem* 1990, 36(10): 1849-1850

Pryor-WA. Can vitamin E protect humans against the pathological effects of ozone in smog? *Am-J-Clin-Nutr*. 1991 Mar; 53(3): 702-22

Pryor-WA. Cigarette smoke and the involvement of free radical reactions in chemical carcinogenesis. *Br-J-Cancer-Suppl*. 1987 Jun; 8: 19-23

Pryor-WA; Castle-L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods-Enzymol* 1984; 105: 293-9

- Pryor-WA; Hales-BJ; Premovic-PI; Church-DF. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science*. 1983 Apr 22; 220(4595): 425-7
- Pryor-WA; Prier-DG; Church-DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ-Health-Perspect*. 1983 Jan; 47: 345-55
- Punchard-NV; Kelly FJ. Free radicals. A practical approach. IRL press Oxford University press. 1996, pp. 119-131
- Rahman-I; Clerch-LB; Massaro-D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am-J-Physiol*. 1991 Jun; 260(6 Pt 1): L412-8
- Randhawa-P; Hass-M; Frank-L; Massaro-D. Dexamethasone increases superoxide dismutase activity in serum-free rat fetal lung organ cultures. *Pediatr-Res*. 1986 Sep; 20(9): 895-8
- Reiss-U; Tappel-AL. Fluorescent product formation and changes in structure of DNA reacted with peroxidizing arachidonic acid. *Lipids*. 1973 Apr; 8(4): 199-202
- Roehm-JN; Hadley-JG; Menzel-DB. The influence of vitamin E on the lung fatty acids of rats exposed to ozone. *Arch-Environ-Health*. 1972 Apr; 24(4): 237-42
- Roehm-JN; Hadley-JG; Menzel-DB. Antioxidants vs lung disease. *Arch-Intern-Med*. 1971 Jul; 128(1): 88-93
- Roubal-WT; Tappel-AL. Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch-Biochem-Biophys*. 1966 Jan; 113(1): 5-8
- Seltzer-J; Bigby-BG; Stulbarg-M; Holtzman-MJ; Nadel-JA; Ueki-IF; Leikauf-GD; Goetzi-EJ; Boushey-HA. O₃-induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J-Apppl-Physiol*. 1986 Apr; 60(4): 1321-6
- Sies-H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H. ed. *Oxidative stress*. London:academic Press, 1985:18-23
- Sies-H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am-J-Med*. 1991 Sep 30; 91(3C): 31S-38S
- Slater-TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem-J*. 1984 Aug 15; 222(1): 1-15

Slutsky-AS; Zamel-N. Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects [see comments] *Lancet*. 1991 Jul 27; 338(8761): 199-203

Stephens-ER. Photochemistry of smog *Calif Air Environment* 1969, 1:27-21

Suarez-BG. Análisis de la calidad atmosférica en la Ciudad de México *Información Científica y Tecnológica* 1991. Vol 13/173: 36-40

Svingen-BA; Buege-JA; O'Neal; Aust-SD. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation *J. Biol Chem*. 1979 Jul. 17(7):5892-99

Tappel-AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed-Proc*. 1973 Aug; 32(8): 1870-4

Theofilopoulos-AN; Dixon-FJ. Autoimmune diseases: immunopathology and etiopathogenesis. *Am-J-Pathol*. 1982 Sep, 108(3): 319-65

Thomas-HV; Mueller-PK; Lyman-RL. Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide *Science*. 1968 Feb 2; 159(814): 532-4

Torres-JR. Construcción y aplicación de trayectorias de retroceso de parcelas de aire al estudio de la contaminación atmosférica por ozono en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México 1979 Tesis de Maestría. División de Estudios de Postgrado. Fac. Ingeniería. UNAM. México D.F.

Umano-K; Dennis-KJ; Shibamoto-T. Analysis of free malondialdehyde in photoirradiated corn oil and beef fat via a pyrazole derivative. *Lipids*. 1988 Aug; 23(8): 811-4

Wayner-DD; Burton-GW; Ingold-KU; Locke-S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS-Lett*. 1985 Jul 22; 187(1): 33-7

Wills-ED. Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem-J*. 1971 Aug; 123(5): 983-91

Wills-ED. Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. *Biochem-J*. 1969 Jun; 113(2): 315-24

Wills-ED; Wilkinson-AE. Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem-J*. 1966 Jun; 99(3): 657-66

Whittemore-AS. and Korn-EZ. Asthma and air pollution in the Los Angeles Area. *Am J Public Health* 1980, 70: 687-696

Yagi-K Assay for blood plasma or serum. *Methods-Enzymol.* 1984; 105: 328-31

Original Article

Inhibitory Capacity of Human Serum on Induced Microsomal Lipoperoxidation¹

JUAN JOSE HICKS and RAFAEL MEDINA-NAVARRO

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

Received for publication June 17, 1994; accepted February 15, 1995 (94/375).

Abstract

The capacity of human serum for inhibiting *in vitro* the membrane lipoperoxidation induced by a controlled system (ADP/NADPH + H⁺/Fe³⁺) was demonstrated. A concentration of 8 nmol of malondialdehyde was produced in 20 min in rat liver microsomes (1.5 mg of protein) after exposure to an induced lipoperoxidation mixture. Addition of 100 µl (13.89 mg of protein) of human serum decreased malondialdehyde production nearly 50%. An increase of 25.97% of the inhibitory capacity of serum was obtained by the *in vitro* addition of 10 µl/ml of vitamin E. Ten volunteers were supplemented

with 400 mg of vitamin E and 1 g of vitamin C/daily for 2 weeks. Their serum inhibitory capacity increased in 12% (p < 0.05). The serum inhibitory capacity for microsomal lipoperoxidation is described herein, and we propose its utilization as an index to determine the individual nonspecific antioxidative defenses against free radical injury and lipoperoxidation in relation to exposure to air pollutants, tobacco smoke, and several acute and chronic diseases, including the hypoxia-reperfusion phenomena. (*Arch Med Res* 1995; 26:169).

KEY WORDS: Antioxidants; Vitamin E; Vitamin C; NADPH-dependent lipoperoxidation; Serum protection.**Introduction**

The formation of highly reactive, oxygen-containing molecular species is a normal consequence of a variety of essential biochemical reactions (1). If a reactive molecule contains one or more unpaired electrons, the molecule is termed a free radical (2). Prime targets for free radical reactions are the unsaturated bonds in membrane lipids, involving oxidative conversion to

primary products known as lipid hydroperoxide (3) (commonly termed lipid peroxides) and a variety of secondary metabolites, including alcohols, ketones, aldehydes, and ethers (4). Consequent peroxidation results in a loss in membrane fluidity and receptor alignment and potentially in cellular lysis (5). Free radical damage to sulfur-containing enzymes and other proteins culminates in inactivation, cross-linking, and denaturation. Nucleic acids can be attacked; subsequent damage to the DNA can cause mutations that may be carcinogenic. Oxidative damage to carbohydrates can alter any of the cellular receptor functions including those associated with hormonal and neurotransmitter responses (6).

Defenses against free radical damage include a variety of molecules with different properties and chemical structure; only three essential nutrients can directly scavange free radicals. Vitamin E (α-tocopherol), the

Correspondence to:

Dr. Juan José Hicks, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, P.O. Box 12-865, México, D.F.

¹This manuscript will be included in a thesis to obtain the M.Sc. degree, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (RMN).

Table I
Serum Inhibitory Capacity (S.I.C.) and Vitamin C and E Concentration Before and After 15 Days of
Vitamin E (400 mg) and Vitamin C (1000 mg) Daily Ingestion

Group	Vitamin E ($\mu\text{g/ml}$)	Vitamin C ($\text{mg}/100\text{ ml}$)	S.I.C. (%)
Before	11.40 \pm 2.3	0.70 \pm 0.50	47.14 \pm 5.3
After	15.74 \pm 1.5*	1.83 \pm 0.53*	54.32 \pm 2.1*

Note: n = 10; values are mean \pm SD.

*Before vs. after p < 0.01.

*Before vs. after p < 0.05.

controlled system (ADP/NADPH + $\text{H}^+/\text{Fe}^{3+}$) as described by Wills (15), was used. The reaction was carried out at different times, utilizing the following reaction mixture: nicotinamide 20 mM, KCl 80 mM, ADP 2 mM, FeCl_2 0.12 mM and NADPH 0.4 mM (Sigma Chemical Co.) (16) and an aliquot containing 1.5 mg of microsomal protein. All the reactants were diluted in phosphate buffer 20 mM pH 7.0, at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 500 μl of trichloroacetic acid (35%). One milliliter of the TBA solution (375 mg/100 ml in HCl 0.2 N) was added, and heated in a boiling water bath for 15 min. The tubes were cooled and the absorbances measured at 535 nm (17). As standard, 1,1,3,3-tetramethoxypropano (Sigma Chemical Co.) was used. When the lipoperoxidation *in vitro* was done in presence of different aliquots of human serum, the inhibitory capacity was expressed as percent.

Vitamin C. The concentration of ascorbic acid in the serum was measured according to the phosphotungstate acid assay of Kyaw (18). The sample reaction (2 ml) with the phosphotungstate acid is completed within 30 min and the absorbance at 700 nm is read against a blank constituted with distilled water. L-ascorbic acid (Merck, Darmstadt) was used as standard.

Vitamin E. Free tocopherol in the serum was assayed with the use of ultraviolet fluorometry, according to the micro method of Hansen and Warwick (19). The tocopherols are extracted from serum with hexane after precipitation of proteins with ethanol. Free tocopherol is exposed to ultraviolet light (295 nm) and the induced fluorescence is measured at 340 nm. Lick standard DL- α tocopherol (Merck, Darmstadt) was used.

Student's t test for paired samples was used for analysis of the results.

Results

Figure 1 shows the different lipoperoxidative capacity of the system ADP/NADPH + $\text{H}^+/\text{Fe}^{3+}$ in relation to time interaction with microsomes. The 5 nmol of malondialdehyde measured was obtained at 5 min of interaction;

however, the increase of the lipoperoxide production continued for 20 min; the control slope (no continuous line) represents the normal *in vitro* lipoperoxidation of microsomal membranes. Figure 2 shows the effect of different serum aliquots (ubecisal) on the lipoperoxidative system assayed. It is possible to obtain nearly 100% inhibition when 46.3 mg of protein is used (400 μl of serum). Consequently, it is necessary to add 13 mg serum protein, in order to obtain 50% inhibition of the induced microsomal lipoperoxidation, utilizing 1.5 mg of microsomal membranes. An increase of the inhibitory effects on lipoperoxidation due to the *in vitro* addition to the reaction mixture of vitamin E (0.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$) was added. The oral administration for 2 weeks of vitamin E and C to the volunteers increased significantly ($p < 0.05$) their serum inhibitory capacity for lipoperoxidation. At the same time the levels of vitamins in serum increased significantly ($p < 0.01$) as well (Table I).

Discussion

Highly reactive molecules called free radicals can cause damage by reacting with polyunsaturated fatty acids in cellular membranes, nucleotides in the DNA, carbohydrates and critical sulfhydryl bonds in proteins including some important enzymes (2). Free radicals can originate endogenously for normal metabolic functions (1) or exogenously as components of tobacco and air pollutants, and indirectly through the metabolism of certain solvents, drugs and pesticides as well as through exposure to radiation (6).

There is some evidence that free radicals contribute to the etiology of many acute and chronic health problems such as those presented after cardiac surgery (20), in the reperfused ischemic heart (21), and mesenteric small bowel (22), emphysema, cardiovascular and inflammatory diseases, cataracts and cancer (16).

The human serum has enzymatic and non-enzymatic mechanisms of defense against free radical damage and contains numerous active molecules that are able to inhibit free radicals. It is important to note that the antioxidant enzymes are primarily intracellular and thus extracellular free radicals, either endogenously produced

Original Article**Inhibitory Capacity of Human Serum on Induced Microsomal Lipoperoxidation¹**

JUAN JOSE HICKS and RAFAEL MEDINA-NAVARRO

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

Received for publication June 17, 1994; accepted February 15, 1995 (94/375).

Abstract

The capacity of human serum for inhibiting *in vitro* the membrane lipoperoxidation induced by a controlled system (ADP/NADPH + H²/Fe³⁺) was demonstrated. A concentration of 8 nmol of malondialdehyde was produced in 20 min in rat liver microsomes (1.5 mg of protein) after exposure to an induced lipoperoxidation mixture. Addition of 100 μ l (13.89 mg of protein) of human serum decreased malondialdehyde production nearly 50%. An increase of 25.97% of the inhibitory capacity of serum was obtained by the *in vitro* addition of 10 μ l/ml of vitamin E. Ten volunteers were supplemented

with 400 mg of vitamin E and 1 g of vitamin C/daily for 2 weeks. Their serum inhibitory capacity increased in 12% ($p < 0.05$). The serum inhibitory capacity for microsomal lipoperoxidation is described herein, and we propose its utilization as an index to determine the individual nonspecific antioxidative defenses against free radical injury and lipoperoxidation in relation to exposure to air pollutants, tobacco smoke, and several acute and chronic diseases, including the hypoxia-reperfusion phenomena. (*Arch Med Res* 1995; 26:169).

KEY WORDS: Antioxidants; Vitamin E; Vitamin C; NADPH-dependent lipoperoxidation; Serum protection.**Introduction**

The formation of highly reactive, oxygen-containing molecular species is a normal consequence of a variety of essential biochemical reactions (1). If a reactive molecule contains one or more unpaired electrons, the molecule is termed a free radical (2). Prime targets for free radical reactions are the unsaturated bonds in membrane lipids, involving oxidative conversion to

primary products known as lipid hydroperoxide (3) (commonly termed lipid peroxides) and a variety of secondary metabolites, including alcohols, ketones, aldehydes, and ethers (4). Consequent peroxidation results in a loss in membrane fluidity and receptor alignment and potentially in cellular lysis (5). Free radical damage to sulfur-containing enzymes and other proteins culminates in inactivation, cross-linking, and denaturation. Nucleic acids can be attacked; subsequent damage to the DNA can cause mutations that may be carcinogenic. Oxidative damage to carbohydrates can alter any of the cellular receptor functions including those associated with hormonal and neurotransmitter responses (6).

Defenses against free radical damage include a variety of molecules with different properties and chemical structure; only three essential nutrients can directly scavenge free radicals. Vitamin E (α -tocopherol), the

Correspondence to: Dr. Juan José Hicks, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, P.O. Box 12-865, México, D.F.

¹This manuscript will be included in a thesis to obtain the M.Sc. degree, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (RMN).

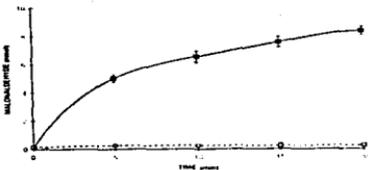


Figure 1. (●), malondialdehyde formation in the NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation. In the dotted line (○), control minus NADPH or ADP. Microsomal protein 1.5 mg/ml; NADPH 0.4 mM. The data are expressed as mean \pm SD from six experiments.

major lipid-soluble antioxidant present in all cellular membranes protects against lipid peroxidation (7). Vitamin E can act directly with a variety of oxy-radicals, including the peroxy radical (ROO \cdot), CCl $_4$ and OH \cdot (8), as well as with the anion superoxide (O $_2^{\cdot-}$) (9). Tocopherol can also react directly with singlet oxygen. Vitamin C (ascorbic acid) is water soluble and, along with vitamin E, can quench free radicals as well as singlet oxygen. Ascorbic acid has been shown to react directly with superoxide (10), hydroxyl radicals and singlet oxygen. Ascorbic acid can also regenerate the reduced, antioxidant form of vitamin E. Since 1984 it has been shown that β -carotene, a pigment found in all plants, is the most efficient quencher of singlet oxygen known in nature and can also function as an antioxidant (11). β -carotene is the major carotenoid precursor of vitamin A. Vitamin A, however, cannot quench singlet oxygen and has a very limited capacity to scavenge free radicals. Included among other serum antioxidants are glutathione, uric acid, bilirubin and several metalloenzymes (glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutases) (12).

The present study describes the inhibitory capacity of the human serum in order to diminish or abolish the induced NADPH-dependent microsomal lipoperoxidation *in vitro*; this capacity might be related with the different antioxidant molecules present in the serum. Additionally, we studied the action of vitamins E and C administered to a group of volunteers, measuring the antioxidant capacity 2 weeks after the ingestion of the vitamins.

Materials and Methods

Sera. Fresh, whole blood (7 ml) was obtained by venipuncture from ten adult volunteers, aged 25 - 35

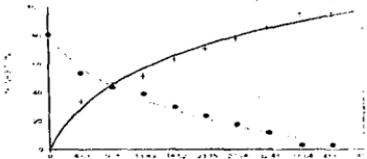


Figure 2. Different amounts of human serum on the induced NADPH-dependent microsomal lipoperoxidation. (○), percent of inhibition (0% of inhibition represents the lipoperoxidation without serum addition); (●), malondialdehyde production (8.09 nmol) represents the malondialdehyde concentration before serum addition. Microsomal protein 1.5 mg/ml, NADPH 0.4 mM, incubation time 60 min. The data are expressed as mean from six experiments.

years. All subjects completed medical histories and were free of any acute or chronic diseases; the serum vitamin concentration and the inhibitory capacity of the serum for *in vitro* induced lipoperoxidation was measured before (control) and after the oral administration of 400 mg of vitamin E (di- α -tocopherol, Searle de México), and 1 g of vitamin C (Roche Laboratories); daily for 2 weeks. Serum was obtained by centrifugation immediately after the blood was drawn; aliquots from 25 to 400 μ l were utilized for antioxidant capacity, 2 ml for vitamin C and 100 μ l for vitamin E. Protein was measured by Lowry's method as reference parameter (13).

Inhibitory Capacity of the Serum. Adult Wistar rats were sacrificed by cervical dislocation and the liver was reperflused with NaCl (0.15 M), removed and weighed. The hepatic tissue was homogenized in 0.25 M sucrose in such a way to prepare a 50% homogenate (1 part tissue, 1 part medium). The homogenate was placed in a centrifuge tube, and an equal volume of 0.34 M sucrose was layered underneath. The discontinuous gradient thus formed was centrifuged for 10 min at 700 \times g. The residue (crude nuclei) was eliminated, and the supernatant was centrifuged for 10 min at 15,000 g. The precipitate (crude mitochondrial fraction) was not used, and the supernatant was centrifuged at 105,000 g for 60 min. The precipitate (crude microsomal fraction) (14) was resuspended in KCl 125 mM (1 ml of solution/g of liver utilized) and protein concentration measured. An aliquot containing 1.5 mg of microsomal protein, present in a volume nearly 100 μ l (15 mg/ml), was utilized as a substrate for lipoperoxidation, measured by the thiobarbituric acid assay (TBA-reactive material). In order to induce lipoperoxidation on microsomal membranes, the effect of free radicals produced by a

Table I
Serum Inhibitory Capacity (S.I.C.) and Vitamin C and E Concentration Before and After 15 Days of
Vitamin E (400 mg) and Vitamin C (1000 mg) Daily Ingestion

Group	Vitamin E ($\mu\text{g/ml}$)	Vitamin C ($\text{mg}/100\text{ ml}$)	S.I.C. (%)
Before	11.40 \pm 2.3	0.70 \pm 0.50	47.14 \pm 5.3
After	15.74 \pm 1.5*	1.83 \pm 0.53*	54.32 \pm 2.1*

Note: n = 10; values are mean \pm SD.

*Before vs. after p < 0.01.

*Before vs. after p < 0.05.

controlled system (ADP/NADPH + H⁺/Fe³⁺) as described by Willis (15), was used. The reaction was carried out at different times, utilizing the following reaction mixture: nicotinamide 20 mM, KCl 80 mM, ADP 2 mM, FeCl₃ 0.12 mM and NADPH 0.4 mM (Sigma Chemical Co.) (16) and an aliquot containing 1.5 mg of microsomal protein. All the reactants were diluted in phosphate buffer 20 mM pH 7.0, at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 500 μl of trichloroacetic acid (35%). One milliliter of the TBA solution (375 mg/100 ml in HCl 0.2 N) was added, and heated in a boiling water bath for 15 min. The tubes were cooled and the absorbances measured at 535 nm (17). As standard, 1,1,3,3-tetramethoxypropano (Sigma Chemical Co.) was used. When the lipoperoxidation *in vitro* was done in presence of different aliquots of human serum, the inhibitory capacity was expressed as percent.

Vitamin C. The concentration of ascorbic acid in the serum was measured according to the phosphotungstate acid assay of Kyaw (18). The sample reaction (2 ml) with the phosphotungstate acid is completed within 30 min and the absorbance at 700 nm is read against a blank constituted with distilled water. L-ascorbic acid (Merck, Darmstadt) was used as standard.

Vitamin E. Free tocopherol in the serum was assayed with the use of ultraviolet fluorometry, according to the micromethod of Hansen and Warwick (19). The tocopherols are extracted from serum with hexane after precipitation of proteins with ethanol. Free tocopherol is exposed to ultraviolet light (295 nm) and the induced fluorescence is measured at 340 nm. Lick standard DL- α tocopherol (Merck, Darmstadt) was used.

Student's t test for paired samples was used for analysis of the results.

Results

Figure 1 shows the different lipoperoxidative capacity of the system ADP/NADPH + H⁺/Fe³⁺ in relation to time interaction with microsomes. The 5 nmol of malondialdehyde measured was obtained at 5 min of interaction;

however, the increase of the lipoperoxide production continued for 20 min; the control slope (no continuous line) represents the normal *in vitro* lipoperoxidation of microsomal membranes. Figure 2 shows the effect of different serum aliquots (abscissa) on the lipoperoxidative system assayed. It is possible to obtain nearly 100% inhibition when 46.3 mg of protein is used (400 μl of serum). Consequently, it is necessary to add 13 mg serum protein, in order to obtain 50% inhibition of the induced microsomal lipoperoxidation, utilizing 1.5 mg of microsomal membranes. An increase of the inhibitory effects on lipoperoxidation due to the *in vitro* addition to the reaction mixture of vitamin E (0.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$) was added. The oral administration for 2 weeks of vitamin E and C to the volunteers increased significantly (p < 0.05) their serum inhibitory capacity for lipoperoxidation. At the same time the levels of vitamins in serum increased significantly (p < 0.01) as well (Table I).

Discussion

Highly reactive molecules called free radicals can cause damage by reacting with polyunsaturated fatty acids in cellular membranes, nucleotides in the DNA, carbohydrates and critical sulphydryl bonds in proteins including some important enzymes (2). Free radicals can originate endogenously for normal metabolic functions (1) or exogenously as components of tobacco and air pollutants, and indirectly through the metabolism of certain solvents, drugs and pesticides as well as through exposure to radiation (6).

There is some evidence that free radicals contribute to the etiology of many acute and chronic health problems such as those presented after cardiac surgery (20), in the reperfused ischemic heart (21), and mesenteric small bowel (22), emphysema, cardiovascular and inflammatory diseases, cataracts and cancer (16).

The human serum has enzymatic and non-enzymatic mechanisms of defense against free radical damage and contains numerous active molecules that are able to inhibit free radicals. It is important to note that the antioxidant enzymes are primarily intracellular and thus extracellular free radicals, either endogenously produced

or from the environment, must be inactivated by the circulating antioxidants such as the vitamins (E, C) as well as other molecules like glutathione, uric acid or bilirubin (16). In this paper we show in human serum the total or nonspecific inhibitory capacity against lipoperoxidation. The inhibitory capacity of the serum increases significantly after 2 weeks of vitamin E administration (Table 1), and the addition in the system of vitamin E increases the inhibitory capacity as well (not shown). We propose utilizing 100 μ l (13 mg) of human serum (Figure 1) for 60 min of incubation, in presence of 1.5 mg of microsomal protein/ml and the NADPH-dependent lipid peroxidation system.

The relative contribution of the molecules responsible for the protective effect of serum vs. lipoperoxidation is not well known (23,24) and consequently the problem remains open to new experimental options.

References

- Taylor AE, Matalon S, Ward PA, Eds. *Physiology of Oxygen Radicals*. Bethesda, MD: American Physiol. Soc., 1986.
- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1.
- Kagan VE. *Lipid Peroxidation in Biomembranes*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988:13.
- Pryor WA, Castle L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1984; 105:293.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, England: Clarendon, 1985.
- Burton GW, Joyce A, Ignell KU. Is the vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983; 221:281.
- McGay PB. Vitamin E interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 1985; 5:323.
- Fukuzawa K, Gebicki JM. Oxidation of alpha tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl and superoxide radicals. *Arch Biochem Biophys* 1983; 226:242.
- Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xantine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 63:463.
- Burton GW, Ingold KV. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984; 244:569.
- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 7:441.
- Lowry O, Rosebrough PR, Farr AJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
- Hernandez O, Aznar R, Hicks JJ, Ballesteros LM, Rosado A. Subcellular distribution of trace metals in the normal and in the copper treated human secretory endometrium. *Contraception* 1975; 11:451.
- Wills ED. Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. *Biochem J* 1969; 113:315.
- Koster JF, Slee KC. Lipid peroxidation on rat liver microsomes. *Biochem Biophys Acta* 1980; 620:489.
- Bird P, Draper H. Comparative studies on the methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984; 105:625.
- Kyaw A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin Chim Acta* 1978; 86:153.
- Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micro method for serum tocopherol. *Am J Clin Pathol* 1966; 36:133.
- Royston D, Fleming JS, Desai JB, Westaby S, Taylor KM. Increased production of peroxidation products associated with cardiac operations: evidence for free radical generation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 91:759.
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parnley LF, Downey JM. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in the myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17:145.
- Gutierrez Vega R, Toledo-Pereyra LH. Acute mesenteric small bowel ischemia in the rat. *Transplantation* 1990; 49:830.
- Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9748.
- Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem Biophys Acta* 1987; 924:408.

Original Article

Possible Effect of Air Pollutants (Mexico City) on Superoxide Dismutase Activity and Serum Lipoperoxides in the Human Adult^{1,2}

JUAN JOSE HICKS, RAFAEL MEDINA-NAVARRO,
ALBERTO GUZMAN-GRENFELL, NIELS WACHER and ALBERTO LIFSHTIZ

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Coordinación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

Received for publication May 24, 1995; accepted November 1, 1995 (95/57).

Abstract

The action of air pollutants, through their constituents, (O₃, NO₂, tobacco smoke) are capable of causing damage due to their lipoperoxidative properties or, indirectly, by inducing production of free radicals. As a consequence of photochemical processes, the ozone levels in the atmosphere of Mexico City are generally higher (mean of 0.325 ppm; period between 1987 - 1992) and may be harmful to health. Sixty seven volunteers (medical doctors), aged 27 - 32 years, were divided into three groups. Group A was composed of those persons (17) who had never lived in Mexico City; a second group (B) (21) had recently arrived in Mexico City

KEY WORDS: Air pollution; Free radicals; Lipoperoxidation; Superoxide dismutase.

(1 - 8 days); and a third group (C) (24) who had permanently resided in Mexico City. Serum was obtained from fresh whole blood. Superoxide dismutase (SOD) activity and thiobarbituric acid-reactive materials were higher in group B while chromolipids and the serum inhibitory capacity (for lipoperoxidation) was higher in group C. The acute exposure to pollutants in group B apparently may have induced SOD as an antioxidant defense and was responsible for the increased level of TBA reactive material. In group C, the significant finding is better antioxidative defenses and slightly higher chromolipids. (*Arch Med Res* 1996; 27:145)

Introduction

Among the various ways to injure and kill cells, there is an important class of reactions dependent on the production of free radical intermediates which trigger an

expanding network of disturbances (1). Extensive studies with model systems and with biological materials *in vitro* have clearly shown that oxygen reactive free radicals can cause tissue damage by reacting with carbohydrates, polyunsaturated fatty acids in cellular membranes, DNA and critical sulphydryl bonds in proteins (2). Oxygen free radicals can originate endogenously from normal metabolic reactions (3) or exogenously as components of tobacco smoke and air pollutants and indirectly through the metabolism of certain solvents, drugs, and pesticides (4).

Lipid peroxidation has been said to be of basic importance in aging in damage to cells by air pollution, in some phases of atherosclerosis and in oxygen toxicity. It is generally regarded as being involved in the formation

Correspondence to:

Dr. Juan José Hicks, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, P.O. Box 12-855, México, D.F. Tel: (52-5) 627-6914.

¹Supported by CONACYT, grant No. F 537-M9306.

²This manuscript will be included in a thesis to obtain the M.Sc. degree, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (RMN).

of age-related lipofuscin pigments that accumulate in the cells of certain organs and that exhibit a characteristic fluorescence spectrum with a maximum at around 460 nm (5).

Rearrangement lipid peroxidation process involves several steps: the formation and propagation of radicals, the uptake of oxygen, a rearrangement of the double bonds resulting in the formation of conjugated dienes (6) in unsaturated lipids, producing a variety of breakdown products, including alcohols, ketones, aldehydes and others (7). The peroxidation of linoleic acid alone results in the formation of at least 20 degradation products.

In biologic materials, the malonaldehydes exist in their free form and as a complex with various tissue constituents. It has also been identified among the products of the oxidative decomposition of amino acids, complex carbohydrates, pentoses, and hexoses formed in the presence of a metal catalyst, as a product of free radicals generated *in vivo* (6). However, peroxidation of fatty acids with three or more double bonds (notably arachidonic acid) is believed to be its major source (1).

Air pollution emissions from all types and sources (8) including particulates in air such as dust, smoke, and aerosols may have both acute and long-term health and environmental effects. These effects range from eye and throat irritation and reduced resistance to infection, to chronic respiratory diseases (9). The health hazard of ozone, the principal oxidant air pollutant of photochemical smog, has been well documented (10). One of its toxic effects has been attributed to its oxidative nature and more specifically to the initiation of lipid peroxidation (11) of polyunsaturated fatty acids, especially C_{20} and C_{22} . This process is a feature of many types of cell injury (12). Preliminary studies of the photochemical process in the air pollution of Mexico City have demonstrated that the ozone levels increased between 1978 and 1985. A recent report indicates that the annual maximum mean concentration of ozone was 0.325 ppm for the period between 1987 - 1992 (5). The Mexican Pollutant Standard Index (IMECA: Índice Metropolitano de Calidad del Aire), similar to the National Ambient Air Quality Standard (NAAQS), considered the limit point 0.11 ppm for 1 h, one day of the year. During 1991, the 0.11 ppm was above 1200 times (13) in Mexico City. At present, the limitation point is exceeded almost daily.

Antioxidant defenses against oxygen free radical damage include tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), β -carotene, glutathione, uric acid, bilirubin (4) and several metalloenzymes including glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9) (selenium) (14), catalase (iron) (15) and superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1) (copper, zinc, manganese) (16).

Based on the growing interest in oxygen free radical effects and the lack of effective information related to the interaction between air pollution and health problems and their relation to any imbalance between prooxidant

and antioxidant forces in which the former dominates may be broadly defined as *oxidative stress* of which lipid peroxidation is one important manifestation (17). In this paper we evaluated the effects of air pollution in Mexico City on serum lipoperoxides and superoxide dismutase (SOD) activity on three groups of medical doctors. One group was composed of those persons who had never lived in Mexico City, another group of new arrivals and a third constituted by permanent residents.

Materials and Methods

Fresh, whole blood was obtained by venipuncture from 62 adult volunteers (medical doctors), aged 27 - 32 years. All subjects completed medical histories and were free of any acute or chronic disease and were non-smokers. Their eating habits (hospital dining room) and time of academic activities were similar. For the study we designed three groups, one (17) composed of volunteers who had never lived in Mexico City (group A); a second (21) composed of those persons who had recently moved to the city (8 days) (group B), and a third group (24) that has permanently resided in Mexico City (group C). Groups B and C were permanently exposed to the highest contaminated zones by ozone in Mexico City (downtown and southeast). Group A was considered exposed to a concentration of contamination detected in the second most polluted city of Mexico (Monterrey).

Atmospheric Monitoring. For group C, the mean of 24 official reports (each hour) daily since March 1988 to the same month in 1994 was considered (0.152 ± 0.021 ppm) and compared with the mean for the first week of March 1994 for group B (0.140 ± 0.036 ppm). The pollution reported during the last 5 years for the city of Monterrey (group A) was considered as a control (0.029 ± 0.009 ppm). The official reports were done for the monitoring stations of the environment atmospheric pollution detectors (government of the respective cities).

Samples and Determinations. After an overnight fast, blood (10 ml) was drawn into evacuated sterile containers. Serum was obtained by centrifugation immediately after the blood formed clots. An aliquot of 100 μ l was utilized for superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1) (SOD), serum inhibitory capacity (SIC), conjugated dienes and thiobarbituric acid reactive substances; for the chromolipids determination 250 μ l of serum was used.

Superoxide dismutase assay. Xanthine-xanthine oxidase system was utilized to generate a superoxide flux which reduced nitroblue tetrazolium (NBT) to give blue formazan (18). The NBT reduction without samples was used as a 100% radical production. With serum sample, the rate of NBT reduction will be inhibited

Table 1
Products of Peroxidation in Relation to the Residence Time in Mexico City

	Group A (n = 17)	Group B (n = 21)	Group C (n = 24)
Thiobarbituric acid-reactive material (nmol MDA/100 ng. Prot.)	4.59 ± 0.7	6.10 ± 1.3*	4.38 ± 1.8
Conjugated dienes (μmol/mg. Prot.)	5.86 ± 1.1	5.26 ± 1.1	5.71 ± 1.3
Chromolipids (% fluorescence)	30.28 ± 4.5	30.00 ± 5.0	35.58 ± 2.9*

*p < 0.01 when compared with groups A and C.

†p < 0.05 when compared with groups A and B.

X ± SD.

Table 2

Superoxide Dismutase Activity and Inhibitory Capacity of Human Blood Serum in Relation to the Residence Time in Mexico City

	Group A (n = 17)	Group B (n = 21)	Group C (n = 24)
Superoxide dismutase (mU/mg. Prot.)	80.00 ± 19.74	109.6 ± 49.9*	74.7 ± 35.7
Inhibitory capacity of the serum TBA-reactive materials (% inhibition)	51.91 ± 2.9	53.5 ± 3.0	55.83 ± 3.2*

*p < 0.05 when compared with groups A and C.

†p < 0.05 when compared with group A.

X ± SD.

inversely to the SOD amount. A unit of superoxide dismutase activity is defined as the amount of protein necessary to inhibit 50% of the reaction under specific conditions.

Serum inhibitory capacity (SIC). This technique measured the activity of human serum to inhibit *in vitro* microsomal rat liver membrane lipoperoxidation (19). In order to induce lipoperoxidation on microsomal membranes, the effect of free radicals produced by a controlled system (ADP/NADPH + H⁺/Fe²⁺), as described by Wills (1969) (20) was used. The reaction mixture consisted of nicotinamide 20 mM, KCl 80 mM, ADP 2 mM, FeCl₃ 0.12 mM, NADPH 0.4 mM and an aliquot containing 1.5 mg of microsomal protein. An aliquot of 100 μl of serum was used for the assay. All the reactants were diluted in phosphate buffer 20 mM (pH 7.0), at 28°C. The reaction was stopped by the addition of 500 μl trichloroacetic acid 35%. One milliliter of the thiobarbituric acid solution (375 mg (100 ml) in HCl 0.2 N) was added, and heated in a boiling bath for 15 min. The tubes were cooled and the absorbance measured at 535 nm. As a standard, 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used. The inhibitory capacity was expressed as percent. Protein was utilized as a reference parameter (21).

Lipoperoxide Determination

Fluorescent chromolipids. The amount of the lipid peroxidation-derived fluorescent chromolipids in serum

samples was assayed according to Esterbauer (22). Serum samples (250 μl) were withdrawn into 1.875 ml of chloroform/methanol (2:1) and centrifuged at 5000 x g for 5 min. After centrifugation, 0.625 ml of chloroform and 0.625 ml of water were added to the supernatant. A 1 ml sample was taken from the chloroform layer and mixed with 0.1 ml of methanol. The fluorescence intensity of this solution was measured at an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 430 nm by using quinine sulfate (0.1 μg/ml) in 0.05 M H₂SO₄ as a standard.

Diene conjugation. Lipids extracted from serum samples (100 μl) by chloroform/methanol (2:1), dried under nitrogen atmosphere and then redissolved in cyclohexane were analyzed spectrophotometrically (at 232 nm) as described by Corongiu (23). Extinction coefficient of 27,000 (M⁻¹ cm⁻¹) was used.

Thiobarbituric acid assay (TBA-reactive material). To the 100 μl serum sample, 200 μl H₂SO₄ 0.66 M and Na₂WO₄ 0.3 M were added. After centrifugation (1000 g/10 min) and addition of 1 ml (0.375%) thiobarbituric acid, the mixture was boiled for 15 min. After cooling, 0.5 ml HCl was added and absorbance read at 535 nm (24). As a standard, 1,1,3,3-tetramethoxypropane (MALONALDEHYDE bis (DIMETHYL ACETAL) (Sigma) was used. Student t test was the statistical method used to analyze the results.

Results

The serum levels of thiobarbituric acid-reactive material, measured as nanomoles of malondialdehyde, were significantly greater ($p < 0.01$) in group B than in groups A and C (Table 1). In contrast, the concentrations of chromolipids were higher in the serum of group C than in groups A and B ($p < 0.05$). There were no statistically significant differences between the concentration of conjugated diene values found in the study groups (Table 1). The antioxidative defenses expressed as SOD activity were higher in group B ($p < 0.05$) with little exposure to Mexico City atmosphere than in groups A and C (Table 2). In contrast to SOD, the serum inhibitory capacity (SIC) was greater in individuals with at least 20 years of exposure to Mexico City polluted air (group C) ($p < 0.05$ when compared with group A).

Discussion

The range of antioxidant defenses available within the cell and extracellularly should be adequate to protect against oxidative damage. However, the balance can be lost because of overproduction of oxygen free radicals, by exposure to sources that overwhelm the antioxidant defenses, or by an inadequate intake of nutrients that contribute to the defense system (2). The pollutant contamination of the air of Mexico City (25) contains high concentrations of ozone (12,26) (the principal oxidant air pollutant of photochemical smog) which causes lung damage (11), increases peroxidation of lung lipids (27) and raises lung glutathione peroxidase activity (GP) presumably in response to an elevated concentration of hydroperoxides in the lung (11). Free radicals may be involved in ozone toxicity, and consequently, the defense mechanisms against cellular damage involve the response of antioxidant enzymes including superoxide dismutase and catalase. Increased activity of Cu, Zn SOD and Mn SOD have been reported to occur in the rat lung during exposure to ozone (28,29). The increased activity of superoxide dismutase in the subjects of group B (Table 2) might represent an acute antioxidative response to air pollution.

However, although it is clear that O_3 exposure increases the substrates for GP and catalase, the evidence is not conclusive that O_3 is converted to the superoxide anion (O_2^-), the substrate for the SOD; thus, in the presumed absence of an elevated concentration of O_2^- , the explanation for the higher activity of serum SOD shown for group A (Table 2) is unclear. A possibility is that O_2^- could be released by phagocytic cells during phagocytosis of debris from tissue damaged by O_3 ; the O_2^- could then conceivably induce increased SOD activity. Another possibility could be related to the induction of SOD by some of the products of lipoperoxidation or corticosteroids (30) released as a response to oxidative stress (16).

The ozone molecule can oxidize target molecules directly or generate free radicals with a capacity to abstract hydrogen from polyunsaturated fatty acids in cell membranes and form lipid peroxides (31). In the present manuscript we report an increase in the concentration of products of peroxidation (TBA reactive material in group B and chromolipids in group C), apparently as a consequence of a severe grade of exposure to atmospheric pollutants.

From the results presented in Table 1 it is possible to observe that there are no differences among groups when conjugated diene concentrations were measured. This finding may be the consequence of the lesser sensitivity and specificity of the method used.

Lipid peroxidation has been said to be of basic importance in aging in damaged cells by air pollution, in some phases of atherosclerosis and in oxygen toxicity. It is generally regarded as being involved in the formation of aging lipofuscin pigments that accumulate in the cells of certain organs with age, and exhibit a characteristic fluorescence spectrum with a maximum at around 460 nm (5).

The chromolipids measured in our experiments demonstrated that group B presented a few more fluorescent exposure products than group A. The concentration was inverse in relation to MDA (Table 1). The chronic exposure to polluted air allowed differences related to the class of lipoperoxidation product formed.

Considering the molecular diversity of the specific defenses against free radical damage (vitamins, substrates, catalases), we studied the serum inhibitory capacity to reduce the induced lipoperoxidation on rat microsomes *in vitro* measured as malonaldehyde (MDA) produced by the effect of free radicals generated (ADP/NADPH + H^+ / Fe^{3+}) under controlled conditions (19). Group C subjects presented a better inhibitory capacity of their serum antioxidant defense for lipoperoxidation than group A. It is possible to consider that the subjects in group B need more time exposed to air pollution in order to obtain an adequate balance in their mechanisms of defense. This group responded with an increase of SOD activity (Table 2).

In conclusion, we found differences in the serum, with increase of SOD activity, SIC, chromolipids and TBA reactive material values when comparing three studied groups with different exposure to air pollution of Mexico City.

References

- Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412.
- Taylor AE, Matolon S, Ward PA. Physiology of the oxygen radicals. *Am Physiol Soc*, Bethesda, MD, 1986.

4. Machlin LJ, Benich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441.
5. Kirugawa K, Murayama T, Machida Y, Kurechi T. Studies of peroxidized lipids. II. Fluorescent products relevant to aging pigments derived from malondialdehyde and methylamine. *Chem Pharm Bull* 1981; 29:1423.
6. Pryor WA, Castle L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1984; 105:293.
7. Buege J. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105:302.
8. Ruckelshaus WD, Alm AL, Russell M, Cooper JS, Brand R. Airborne Particulates. Environmental Progress and Challenges: An EPA Perspective. USA, 1984; p. 22.
9. Ruckelshaus WD, Alm AL, Russell M, Cooper JS, Brand R. Airborne Toxics. Environmental Progress and Challenges: An EPA Perspective. USA, 1984; p. 33.
10. Stephens RJ, Sloan MM, Evans MJ, Freeman G. Early responses of the lung to low levels of ozone. *Am J Pathol* 1973; 74:31.
11. Rahman I, Clerch LB, Massaro D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am J Physiol* 1991; 260:1412.
12. Bravo A, Sosa RE, Roy-Oculta GR, Sánchez PA. Control Strategies vs. Meteorology. Case: México City. Presented at the 86th Annual Meeting & Exhibition, Denver, CO, USA, 1993.
13. Suarez BG. Análisis de la calidad atmosférica en la Ciudad de México. *Inf Cient Tecnol* 1991; 13:173.
14. Mello-Filho AC, Meneghini R. *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim Biophys Acta* 1984; 781:56.
15. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1973; 53:527.
16. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissue from nine mammalian species. *Biochem J* 1984; 222:649.
17. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, Ed. *Oxidative Stress*. Vol. 22. London: Academic Press, 1985:649.
18. Beuchamp CL, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44:276.
19. Hicks JJ, Medina-Navarro R. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. *Arch Med Res* 1995; 26:169.
20. Wills ED. Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. *Biochem J* 1969; 113:315.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
22. Esterbauer H, Koller E, Slez R, Kostar J. Possible involvement of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochem J* 1986; 239:405.
23. Corongiu F, Lai M, Milia A. Carbon tetrachloride, bisnitriclu-tuomethane and ethane acute intoxication. *Biochem J* 1983; 212:625.
24. Bird P, Draper H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1980; 620:489.
25. Bravo A. Preliminary study of the photochemical process in the air pollution of México City. International Clean Air Conference. Brisbane, Australia, 1978.
26. Bravo A, Torres J. Ozone monitoring and night concentration events at the campus of the University of México. 78th Annual Meeting of the Air Pollution Control Association. Detroit, MI, USA, 1978.
27. Koster JF, Slez RG. Lipid peroxidation on rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1980; 620:489.
28. Dubick M, Keen C. Tissue trace elements and lung superoxide dismutase activity in mice exposed to ozone. *Toxicol Lett* 1983; 17:355.
29. Dubick M, Zidemberg-Cherp R, Rucker R, Keen C. Superoxide dismutase activity in mice exposed to ozone. *Toxicol Lett* 1988; 42:149.
30. Raghava P, Hass M, Massaro D. Dexamethasone increases superoxide dismutase activity in serum-free rat fetal lung organ cultures. *Pediatr Res* 1986; 24:895.
31. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Rad Biol Med* 1990; 9:245.