



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Daño oxidante en células epiteliales de pulmón
humano (A549), inducido por aeropartículas
contaminantes (PM₁₀), de la Ciudad de México”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A :
Yazmin Segura García.

TUTOR
M. en C. Yesennia Sánchez Pérez

2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a la **M. en C Yesennia Sánchez Pérez** por todo el apoyo recibido durante la realización de la tesis.

A la **Dra. Claudia María García Cuellar**, por su dedicación y apoyo en toda mi estancia dentro y fuera del Instituto.

A la **Dra. Irma Rosas Pérez**, por su amable atención en la revisión de este trabajo, sus comentarios y sugerencias.

A la **Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz**, por la revisión de este trabajo, sus comentarios y sugerencias.

Al **Dr. Álvaro Osornio Vargas** por todos los consejos, sugerencias y su amistad.

Al **Dr. Ernesto Alfaro Moreno** por su amistad y apoyo que me brindo durante el tiempo que estuvo en México.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto Nacional de Cancerología, fue apoyado por los fondos "Parker B. Francis Fellowship, USA", CONACyT 43183-M, AC-2006-52830, y la campaña MILAGRO

DEDICATORIA

A mis padres Miguel Ángel y María de Jesús por todo su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos Yuriria, Rocío y Miguel Angel por su cariño y por ser la fuerza que me ayuda a seguir adelante.

A mis abuelos Angel Segura y Francisca Vidal y a mis tíos Conchita, Martha, Lupe, Arturo, José Luis y Fernando por cada uno de sus consejos, apoyo, pero sobre todo por ser un ejemplo a seguir.

A mis primos Alethia, Tanya, Nadia, Omar, Elena, Danielita, Fátima, Fernando y Toñito por las alegrías que siempre pasamos.

A mis verdaderos amigos, Kristel Gopar, Mariana Morales, Adriana Corach, Eden Martínez, Israel Mendoza, Héctor S. Figueroa, ¡gracias!

A mis compañeros y amigos del laboratorio de toxicología ambiental que siempre me animaron y con los cuales pase muy buenos momentos, Graciela Yescas, Inés Vázquez, Raúl Quintana Belmares.

INDICE	Página
INTRODUCCIÓN	9
RESUMEN	10
<i>I. Las aeropartículas contaminantes</i>	12
<i>1.1 Estudios epidemiológicos y toxicológicos con Aeropartículas</i>	15
<i>II. Estrés oxidante</i>	19
<i>2.1 Mecanismo antioxidante</i>	20
<i>2.2 Blancos moleculares de especies reactivas de oxígeno</i>	24
<i>III. Área de estudio</i>	26
<i>3.1 Efecto de las aeropartículas de la ciudad de México</i>	28
<i>3.2 Composición de las aeropartículas utilizadas en este trabajo</i>	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	35

MATERIAL Y MÉTODOS

- ***Obtención de PM₁₀.*** 36
- ***Cultivo celular.*** 37
- ***Exposición de células a PM₁₀.*** 37
- ***Evaluación de viabilidad celular mediante la técnica de cristal violeta.*** 38
- ***Especies reactivas de oxígeno intracelulares*** 39
- ***Inmunodetección de SOD Mn, SOD Cu/Zn y catalasa*** 40
- ***Actividad de SOD total y catalasa*** 42
- ***Evaluación de lipoperoxidación*** 44
- ***Evaluación de daño a DNA mediante la formación de aductos de 8-oxoguanina, analizados por microscopia de fluorescencia*** 45
- ***Análisis estadístico*** 46
- ***Presentación de figuras*** 46

RESULTADOS 47

DISCUSIÓN 55

CONCLUSIONES 63

PERSPECTIVAS 64

ANEXO 1

- **Especies reactivas de oxígeno** **65**
- **Formación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos** **69**

ANEXO 2

- **Mecanismos antioxidantes** **73**

ANEXO 3

- **Efectos sobre moléculas biológicas** **76**

LISTA DE ABREVIATURAS **78**

BIBLIOGRAFIA **80**

II INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es un problema que presentan las grandes ciudades y es un factor de riesgo para la salud de la población (Vallejo, *et al.*, 2003, Potter, 1997). Recientes estudios han sugerido que la exposición a estas aeropartículas incrementan el riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y cáncer de pulmón (Norman, *et al.*, 2007). Estudios epidemiológicos y toxicológicos sugieren que uno de los mecanismo de daño que inducen las aeropartículas es resultado del estrés oxidante (Balduzzi 2003, Brown, *et al.*, 2007, Choi, *et al.*, 2004), sin embargo los mecanismo implicados en este proceso no están del todo esclarecidos.

Este estudio pretende explicar una parte de los mecanismos de acción de daño de las aeropartículas y englobar procesos celulares implicados en el estrés oxidante, evaluando el incremento de ROS, el nivel de expresión y actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y el daño a lípidos y DNA de células de epitelio alveolar humano (A549).

RESUMEN

La contaminación del aire es un problema grave, principalmente en las zonas urbanas. Dentro de los componentes de la contaminación se encuentran las aeropartículas contaminantes, que son una mezcla compleja de material orgánico e inorgánico y se han propuesto como un factor de riesgo en la salud de los habitantes, siendo más vulnerables los niños, los ancianos y personas con asma o enfermedades respiratorias. En trabajos previos se ha demostrado que muchos de los efectos negativos que producen las aeropartículas está relacionado a la generación de las especies reactivas de oxígeno.

Para este estudio se colectaron aeropartículas con un tamaño aerodinámico \leq a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) de dos zonas de la ciudad con características diferentes en cuanto a la emisión de sus contaminantes; una zona urbano-industrial y una zona urbano-comercial.

En este trabajo se evaluó el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, el nivel de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa de manganeso (SOD-Mn), de cobre zinc (SOD Cu/Zn) y catalasa. El daño oxidante se midió evaluando lipoperoxidación y aductos de 8-oxoguanina, en células de epitelio alveolar humano (A549), expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la zona urbana-industrial y la zona urbana-comercial, durante 24 h. Para evaluar la participación del estrés oxidante se realizaron experimentos en paralelo con el antioxidante Trolox.

Las aeropartículas indujeron el incremento de especies reactivas de oxígeno de manera diferencial, siendo la zona urbano-industrial menor que la zona urbano-comercial, de manera relevante las aeropartículas de la zona urbano-industrial indujeron cambios en las enzimas antioxidantes, incrementando la actividad de SOD total y disminución de catalasa, las partículas provenientes de la zona urbano-comercial indujeron efectos en la expresión de SOD Cu/Zn

y una inhibición en la actividad de SOD total y catalasa, la lipoperoxidación fue inducida por ambas zonas, siendo la zona urbano-comercial la que causó mayor daño a lípidos, la evaluación cualitativa de aductos 8-oxoguanina, mostró que ambas zonas fueron capaces de inducir este daño, aunque la zona urbano-comercial indujo una mayor formación de estos.

El estrés oxidante juega un papel muy importante en los mecanismos inducidos por las aeropartículas ya que existió un aumento de ROS y daño oxidante y Tlx disminuyó este daño; de manera importante los cambios en la actividad de las enzimas no estuvo relacionada al estrés oxidante, pero probablemente estos cambios estén dados por la interacción de algunos componentes presentes en las aeropartículas.

Este trabajo muestra por primera vez en células expuestas a PM₁₀, que las partículas procedentes de la ZUI incrementan la actividad de SOD total y disminuyen la actividad de catalasa, mientras que las procedentes de la ZUC disminuyen la actividad de ambas (SOD total y catalasa) y que esta inhibición no fue dependiente del estrés oxidante, por lo que se propone que los componentes de las aeropartículas interactúan directamente con las enzimas antioxidantes y de esta manera inhiben su actividad.

I. Las aeropartículas contaminantes

La calidad del aire se evalúa midiendo los contaminantes criterio que son, bióxido de azufre (SO_2), bióxido de nitrógeno (NO_2), partículas suspendidas totales (PST), plomo (Pb) y monóxido de carbono (CO). Estos contaminantes son emitidos en forma directa por la combustión y diversos procesos industriales; así como la erosión y los incendios, por lo que se conocen como contaminantes primarios (INE 2007).

Las partículas suspendidas totales (PST) forman parte de los contaminantes atmosféricos y se dividen por su tamaño aerodinámico en PM_{10} , $\leq 10 \mu\text{m}$, éstas contienen a las $\text{PM}_{2.5}$ con un tamaño $\leq 2.5 \mu\text{m}$ y las partículas ultrafinas o nucleares que incluyen partículas menores a $0.1 \mu\text{m}$ de diámetro aerodinámico (Fig.1).

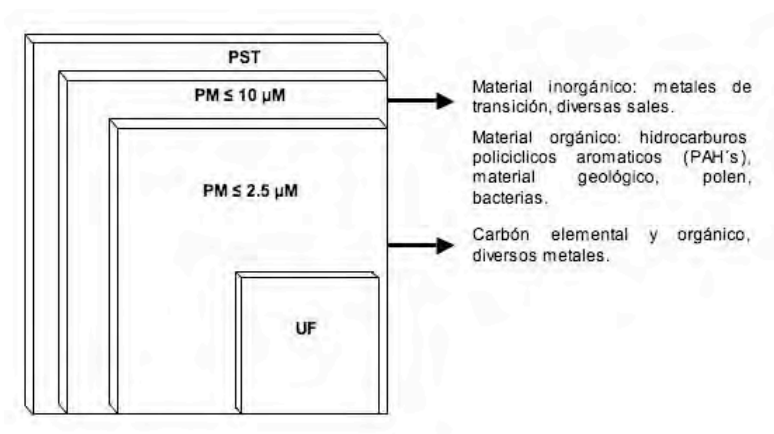


Figura 1.- Fracciones de las partículas suspendidas totales (PST). Las áreas de los cuadros se aproximan a la relativa contribución de PMs, modificado de Englert 2004.

Las aeropartículas son una mezcla compleja de materiales tanto orgánicos como inorgánicos, se pueden encontrar agregados de carbono elemental u orgánico, metales de transición, diversas sales, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's), material biológico como endotoxina (componente de la pared celular de bacterias gram negativas, constituida por lípidos y polisacaridos), hongos, polen, algas, protozoarios e insectos (Fig.2)

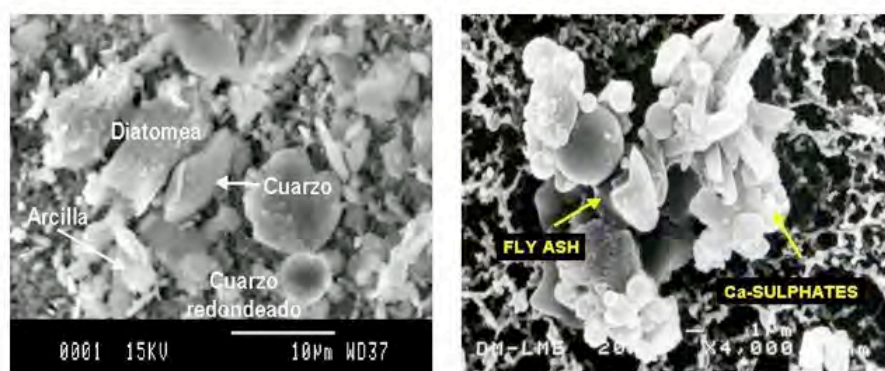


Figura 2.- Las aeropartículas pueden contener diversos componentes de acuerdo a su origen.

Los compuestos orgánicos, como los lipopolisacáridos se han considerado como un factor de exacerbación y desarrollo de asma (Rosas, *et al.*, 1994, Schwart, *et al.*, 2001).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en las partículas, se han asociado a una serie de efectos como aberraciones cromosómicas y daño oxidante en DNA (Taioli, *et al.*, 2007, Zidzik, *et al.*, 2007).

En las PMs también se encuentran diversos elementos y metales de transición siendo los más abundantes: Fe, Cr, Cu, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Mn, Ni, Zn, Se y Pb. Estos elementos se han asociado a diferentes fuentes de

emisión como los producidos por la combustión del petróleo (S, V y Ni). Los originados por la erosión de las rocas (Fe, K, Ca y Ti). Los provenientes de la industria (Mn, Cu, Zn, Se, Pb, Cl y Cr) (Miranda, *et al.*, 2005). Dentro de estos elementos los metales de transición y los diferentes componentes orgánicos son importantes en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), (Choi, *et al.*, 2004, Dick, *et al.*, 2003, Donalson, *et al.*, 1997, Lee, *et al.*, 2006).

1.1 Estudios epidemiológicos y toxicológicos con aeropartículas

Las partículas \leq a PM_{10} son las partículas que por su tamaño aerodinámico pueden permanecer en las vías respiratorias superiores, fosas nasales, laringe, faringe e inclusive depositarse en las bifurcaciones de los alvéolos (Balásházy, *et al.*, 2003, Brauer, *et al.*, 2001), por lo que esta fracción se ha considerado un factor de riesgo para la salud en la población por el desarrollo de diversas alteraciones en órganos blanco como el pulmón, donde pueden inducir inflamación, progresión de enfermedades obstructivas pulmonares crónicas (COPD). En el corazón se ha visto que pueden alterar la función autónoma cardíaca e incrementan la susceptibilidad de disrritmias. En el cerebro pueden inducir isquemia cerebrovascular (Pope y Dockery, 2006) (Fig. 3).

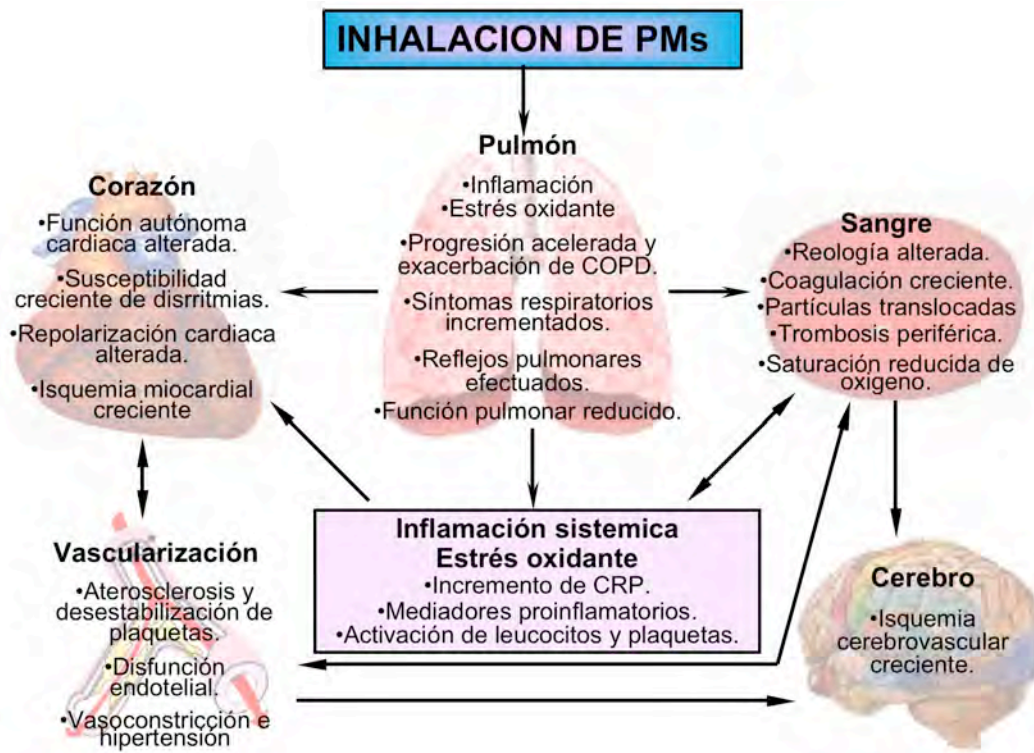


Figura 3.- Vías potenciales de daño patofisiológico, asociado a la inhalación de PMs tomado de Pope y Dockery, 2006.

Estudios epidemiológicos han demostrado que las aeropartículas pueden conducir a un número de problemas en la salud del ser humano, incluyendo enfermedades cardiovasculares y respiratorias (Alfaro-Moreno, *et al.*, 2007, Choi, *et al.*, 2004, Delfino 2005, Lagorio, *et al.*, 2006), y tienen efectos sobre el desarrollo de los pulmones de niños (Dockery, *et al.*, 1993, Gauderman, *et al.*, 2004, Hernández-Cadena, *et al.*, 2007, Pope, *et al.*, 2004, Rojas-Martínez, *et al.*, 2007, Von Klot, *et al.*, 2003); y es uno de los factores de riesgo para desarrollar cáncer pulmonar (Kampa, *et al.*, 2007, Pope, *et al.*, 2002, Pope, *et al.*, 2006).

En estudios con células de pulmón de rata demostraron que las aeropartículas inducen fragmentación del DNA y lipoperoxidación como consecuencia del estrés oxidante inducidos por las aeropartículas (Choi, *et al.*, 2004).

En un estudio realizado *in vitro* con partículas de diferente composición asociada a su toxicidad (dada por el contenido de metales), se observó que estas partículas inducen una disminución en la actividad de enzimas encargadas del equilibrio del estrés oxidante, estas enzimas fueron SOD-Mn y SOD Cu/Zn, la consecuencia de la inhibición en estas enzimas fue atribuida principalmente a los metales contenidos en cada una de las partículas utilizadas, los cuales pueden interactuar de manera directa con los sitios de unión a metales de estas enzimas (Hatzis, *et al.*, 2006).

Dentro de las aeropartículas además de los metales existen componentes orgánicos e inorgánicos que pueden generar daño de manera diversa por distintas vías de acción como la activación de macrófagos, metabolitos reactivos generados por el citocromo p450, interacción directa con sitios activos de enzimas antioxidantes, reacción tipo Fenton, generando una condición de estrés oxidante, la cual puede generar diversas alteraciones al organismo, dando como consecuencia patologías como el cáncer (Fig. 4).

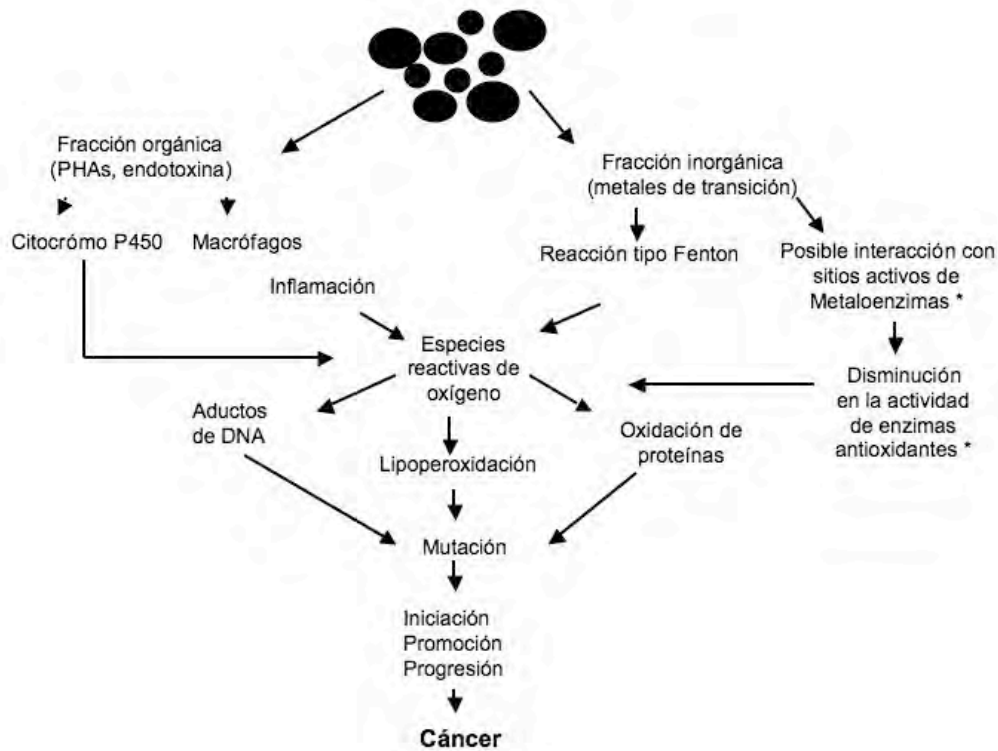


Figura 4.- Mecanismo de acción de los componentes orgánicos e inorgánicos de las aeropartículas. * Hatzis, et al., 2006.

Los estudios epidemiológicos y toxicológicos han coincidido en una hipótesis central la cual señala que uno de los mecanismos del daño inducido por las aeropartículas se basa principalmente en eventos ligados al estrés oxidante (Dick, *et al.*, 2003, Donalson 1997 y 2003, Genestra, 2007).

II. Estrés oxidante

El estrés oxidante es el desbalance entre la generación de compuestos antioxidantes y oxidantes. En nuestro organismo se producen diversas especies reactivas de manera natural ya que son consecuencia del metabolismo aerobio. Sin embargo existen agentes endógenos y exógenos que pueden incrementar los niveles de estas especies reactivas. Dentro de los agentes endógenos podemos mencionar la mitocondria, los peroxisomas, el citocromo p450, y la activación de células inflamatorias. Entre los agentes exógenos que producen especies reactivas están agentes ambientales, xenobióticos, componentes clorados, PHA's, y radiaciones de luz ultravioleta (Waris, et al., 2006). Dentro de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que se genera a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que es el producto de la reducción molecular del oxígeno en singlete. Si bien el H_2O_2 no se considera radical libre es un precursor potencial del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y éste último es un radical altamente reactivo, (ver anexo 1).

La importancia del estrés oxidante es por que puede alterar procesos celulares como la transducción de señales, expresión genética, y la proliferación celular. Estas alteraciones se han ligado con varias patologías como la arterosclerosis, artritis, desordenes neurodegenerativos y cáncer (Salnikow, et al., 2000). Sin embargo la célula dispone de mecanismos de defensa como respuesta ante estrés oxidante teniendo compuestos como glutatión y las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.

2.1 Mecanismos antioxidantes

Uno de los mecanismos de defensa antioxidante está caracterizado por sustancias que actúan de manera directa o indirecta para proteger a las células de los agentes endógenos y exógenos, estos antioxidantes incluye a la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, la vitamina E (α tocoferol), tioles, carotenoides y flavonoides entre otros (Valko, *et al.*, 2006).

Otro mecanismo de defensa esta mediado por enzimas como SOD, glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (Valko, *et al.*, 2006). SOD es un homodímero que destruye al ión superóxido (O_2^-) transformándolo a O_2 y H_2O_2 . Existen tres tipos de dismutasas en eucariontes, la SOD-Mn que se encuentra en el espacio intermembranal mitocondrial. La SOD-Cu/Zn que es una proteína citosólica y la SOD-Ec que es una proteína extracelular (Okado, *et al.*, 2001).

Estas enzimas se encuentran en todos los tipos celulares pero se ha visto que en ciertos órganos y tejidos se expresan de forma diferencial y esta relacionada con las concentraciones de oxígeno, En la tabla 1 se muestran algunos tipos celulares donde se expresa SOD.

Tabla 1.- Sitios de expresión celular de las superóxido dismutasas en pulmón humano

SOD Mn	<ul style="list-style-type: none">• Células alveolares tipo II• Macrofagos alveolares• Epitelio bronquial
SOD Cu/Zn	<ul style="list-style-type: none">• Epitelio bronquial• Macrofagos alveolares• Células alveolares tipo II

La catalasa tiene una estructura tetra hemínica y participa en la eliminación de H_2O_2 convirtiéndolo en agua (H_2O) y O_2 .

La glutatión peroxidasa (GPX) es dependiente de selenio, para su función utiliza glutatión reducido como donante de electrones, también depende de la glutatión reductasa, la cual garantiza el estado reducido del glutatión (ver anexo 2) (Fig. 5).

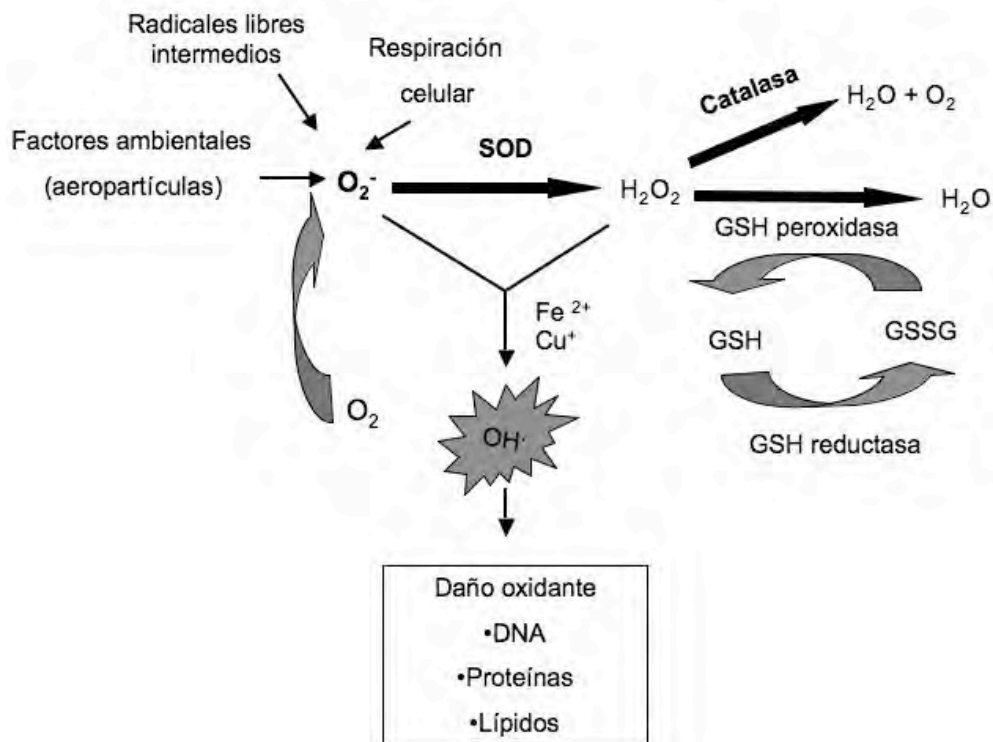


Figura 5.- Enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa.

SOD, catalasa y glutatión se encargan de mantener la homeostasis celular pero puede existir una mala regulación o alteración en éstas, que tienen como consecuencia diversas alteraciones celulares como el daño a macromoléculas, esta alteración en las enzimas puede ser por diversas causas, una de ellas es la condición oxidante que generan, diversos organismos y esta condición pueden inhibir la actividad de estas enzimas (O'malley, *et al.*, 2003), los productos generados por el daño oxidante a lípidos son altamente reactivos por lo que también pueden ser agentes que dañen la función o estructura de las proteínas antioxidantes. En ensayos *in vitro* con partículas con diferente grado de toxicidad dada por el contenido de metales se han encontrado evidencias de que existen componentes como los metales de transición que pueden interactuar de manera directa con sitios de

unión a metales teniendo como consecuencia la disminución de actividad en SOD-Mn y SOD Cu/Zn (Hatzis, *et al.*, 2006, Stohs, *et al.*, 1995), por otra parte algunos metales pueden dar lugar a la reacción tipo Fenton la cual genera un ambiente oxidante y esto altera diversos aminoácidos (Stadtman, *et al.*, 1991). Los iones metálicos de igual manera alteran y promueven la oxidación de proteínas (Stadtman, *et al.*, 1995). Las consecuencias biológicas de las diversas modificaciones pueden desencadenar una serie de alteraciones tanto funcionales como estructurales desencadenando patologías como cáncer (Okeson, *et al.*, 2004, Singh, *et al.*, 2007, Taioli, *et al.*, 2007, Therond, 2003).

Además de los compuestos naturales y enzimáticos, en los últimos años se han sintetizado compuestos que actúan como antioxidantes utilizados para minimizar los daños ocasionados por los radicales libres, uno de estos compuestos es el análogo de la vitamina E, llamado Trolox (Fig. 6) este antioxidante tiene diferentes propiedades una de ellas es que es hidrosoluble y tiene una gran afinidad por los radicales, principalmente el radical OH[·].

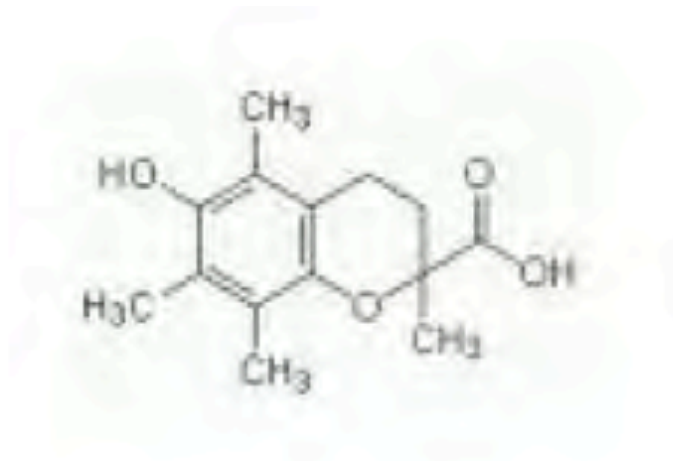


Figura 5.- Estructura química de Trolox, compuesto soluble análogo de la vitamina E.

2.2 Blancos moleculares de las especies reactivas de oxígeno

Ante la generación excesiva de radicales libres y un mal manejo de estos se pueden afectar diversas macromoléculas, y los blancos principales de ROS son lípidos, DNA y proteínas.

La interacción de un radical libre como OH^\cdot con un ácido graso generalmente triacilgliceroles ó fosfoacilgliceroles ubicados en la membrana celular se le conoce como lipoperoxidación, ésta tiene como consecuencia la desestabilización de la membrana. En la lipoperoxidación se forma un producto que es el malodialdehido (MDA) (Sing, *et al.*, 2007) el cual es promutagénico ya que puede interactuar con las proteínas y el DNA llevando de esta manera a mutaciones, por esta razón este daño a lípidos se asocia con la etiología de diversos padecimientos como son el proceso de

envejecimiento celular, la arterosclerosis, la artritis reumatoide y cáncer (Sing, *et al.*, 2007).

Otro blanco de las ROS son los ácidos nucleicos. Se ha demostrado que el DNA es atacado por radicales libres formados en la células, como en el caso de las radiaciones ionizantes, los radicales libres, principalmente el radical $\text{OH}\cdot$ puede reaccionar con la desoxirribosa, transformándola en una gran cantidad de diferentes productos algunos altamente mutágenos. Además pueden actuar directamente sobre las bases púricas y pirimidícas, como en el caso del doble enlace de la timina para convertirla en timinaglicol al que le confiere carácter de radical libre. Este puede reaccionar con oxígeno para formar peroxitimina (muy reactiva) uniéndose a moléculas adyacentes modificando la estructura del DNA, además de dañar bases y formar aductos que consecuentemente pueden ser la causa de diversas enfermedades como cáncer (Peskin, 1997, Therond, 2006).

En las proteínas se han identificado residuos de aminoácidos que son modificados por reacciones oxidativas: metionina, histidina, cisterna, prolina, triptofano, lisina y tirosina. Sus modificaciones químicas pueden dar lugar a modificaciones estructurales que a su vez desencadenen alteraciones funcionales y estructurales (Therond, 2006) (ver anexo 3).

III. Área de estudio

La ciudad de México (CM) se ha caracterizado por ser una de las ciudades más contaminadas del mundo, factores como el crecimiento industrial, el aumento en la urbanización y las actividades antropogénicas han provocado un impacto negativo en el ambiente, y el problema de la contaminación del aire en esta ciudad se agrava por sus características geográficas, topográficas y meteorológicas, ya que ésta se encuentra en un valle con clima templado y rodeado de montañas a una altitud de 2240 msnm.

La distribución en las actividades antropogénicas de la ciudad han permitido abordar estudios de los efectos tóxicos de las aeropartículas contaminantes, relacionados a su composición, ya que podemos emplear muestras de distintas zonas de la ciudad con diferente influencia encunto a la emisión de sus contaminantes, regionalizándola en tres zonas caracterizadas como la zona urbano-industrial (ZUI), que presenta principalmente actividad industrial, así como tráfico vehicular, la zona urbano comercial (ZUC) se distingue por un alto tránsito de automóviles y pocas áreas verdes, y por último la zona urbano-residencial (ZUR) caracterizada por tener emisión de contaminantes por automóviles y fuentes naturales (polen-suelo), ya que cuenta con áreas verdes (Miranda, *et al.*, 2000, Rosas, *et al.*, 2004) (Fig.7)

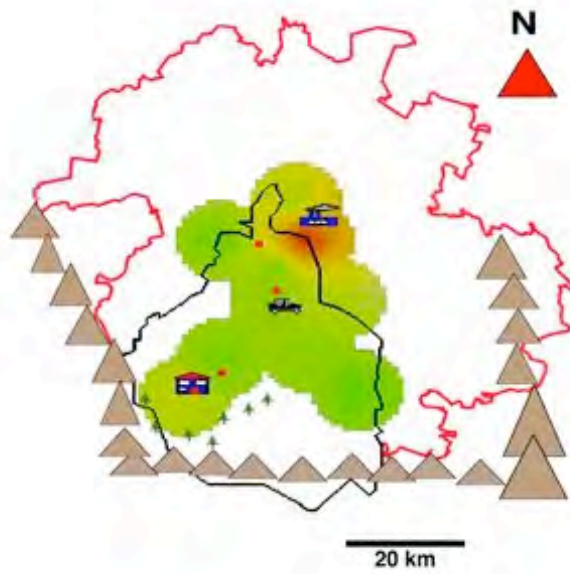


Figura 7.- El área metropolitana se encuentra compartida entre dos entidades federativas: el distrito federal (línea en negro) y el estado de México (línea roja). El monitoreo de partículas se lleva acabo en el área norte (ZUI) en la zona centro (ZUC) y en la zona sur (ZUR) tomado de Alfaro-Moreno, *et al.*, 2002.

3.1 Efectos de las aeropartículas de la ciudad de México

Los resultados en estudios realizados en la CM, muestran una asociación significativa entre las partículas y mortalidad total estimando en conjunto un incremento de la mortalidad diaria de 1.4% por un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en las concentraciones de PM_{10} (Evans, 2002). El riesgo de muerte con respecto a las PST es de un 5.8% de mortalidad por cada $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Borja, *et al.*, 1997), sin embargo el incremento en la fracción de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ representa el 1.83% al 1.48% de riesgo de muerte por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de estas partículas en la atmósfera (Castilejos, *et al.*, 2000, Borja, *et al.*, 1998), estos datos han ido cambiando a través del tiempo así como las condiciones atmosféricas de esta ciudad.

Las PM_{10} de la CM han demostrado efectos citotóxicos como apoptosis y daño a DNA inducido mayormente con partículas provenientes de la ZUI, los efectos proinflamatorios como la activación de IL-6, $\text{TNF } \alpha$ y PGE_2 , fueron inducidos por ambas, pero fue mayor con las aeropartículas de la ZUC (Tabla 2) (Alfaro-Moreno, *et al.*, 2002).

Tabla 2.- Evaluación semicuantitativa de los efectos inducidos por PM₁₀ de la Ciudad de México.

Zona	Efectos Citotóxicos			Efectos Proinflamatorios			
	Toxicidad	Apoptosis	Daño a DNA	TNF α	IL-6	PGE ₂	E-selectina
Norte	+++	+++	+++	++	++	+	++
Centro	++	++	+++	+++	+++	+++	++
Sur	++	+	++	+	+	++	++

El numero de símbolos + indican la magnitud de los efectos observados, tomado de Alfaro-Moreno, *et al.*, 2002.

En ensayos con DNA desnudo se determinó que las PM indujeron ruptura de DNA solo en presencia de H₂O₂, probablemente vía reacción de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ ---→ Fe³ + OH⁻ OH[·]) y se observó que el daño es diferencial dependiendo de la zona de colecta de las partículas, siendo la ZUI más dañina, seguida de la ZUC y por último la menos dañina es la ZUR (García-Cuellar, *et al.*, 2002).

La composición de las aeropartículas es un factor importante en el daño inducido al DNA ya que en un análisis realizado con la fracción soluble de metales de transición y la de orgánicos se demostró que la fracción de metales conduce a un mayor daño en el DNA (Gutiérrez-Castillo, *et al.*, 2006).

Estos estudios indican que existen diferencias entre los efectos biológicos y que la magnitud del daño esta relacionado a la composición de las partículas.

3.3 Composición de las aeropartículas utilizadas en este trabajo.

Las aeropartículas utilizadas en ese trabajo se obtuvieron en el periodo Octubre 2004 a Mayo 2005, procedentes de dos zonas de la CM caracterizadas por tener diferentes fuentes de emisión de contaminantes. Se encontraron metales como Fe, Cu, Ni, Zn, Mn, Pb, Cr, V y Ti, aunque ambas zonas presentaron estos metales, las proporciones fueron diferentes. Las partículas, de la ZUI presentaron el mayor contenido de Fe, Zn y Ti, y en la ZUC, y el Cu fue mayor en las aeropartículas provenientes de la ZUC. El análisis elemental de las aeropartículas se realizó mediante la emisión de ratos-X inducido por partículas (PIXE).

Las partículas utilizadas contienen diferente proporción de endotoxina siendo la ZUC la que presentó una mayor cantidad de esta. Mediante un ensayo de cinética cromogénica con lisados de amebocitos *Limulus* (LAL) se determinó la cantidad de endotoxina que tenían las muestras (Sánchez-Pérez, *et al.*, en proceso) (Fig.8).

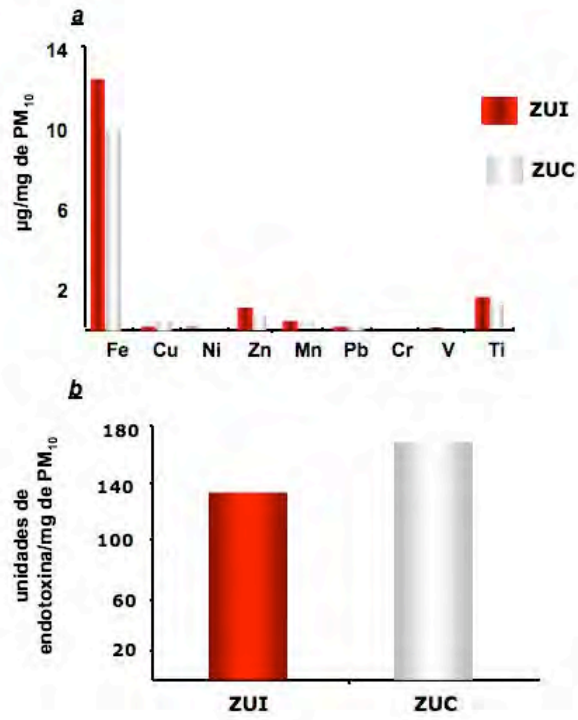


Figura 8.- Contenido de metales y endotoxina de PM₁₀ de la ZUI y ZUC del periodo 2004-2005, (Sánchez-Pérez, *et al.* en proceso) muestras utilizadas en este trabajo.

JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental representan un factor de riesgo para la salud de la población, y uno de los componentes de esta contaminación son las aeropartículas, antecedentes demuestran que éstas inducen efectos citotóxicos e inflamatorios dependiendo de su procedencia y de su composición. Tanto los estudios epidemiológicos como los toxicológicos han coincidido en una hipótesis dominante en la que uno de los mecanismos de daño es a través del estrés oxidante que inducen las aeropartículas.

Sin embargo poco se sabe del mecanismo celular, mediante el cual las PM inducen daño. Por lo que en este trabajo por primera vez se evaluaron procesos como la generación de ROS, el nivel de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, y consecuentemente el daño a lípidos y DNA en una línea celular de epitelio alveolar humano (A549), utilizando aeropartículas de dos zonas (ZUI y ZUC)

Además del conocimiento científico generado en este trabajo nuestros resultados pueden aportar evidencias que sustenten la implementación o modificación de normas ambientales que permitan una mejor regulación en cuanto a la emisión de contaminantes en nuestra ciudad.

HIPÓTESIS

Debido a que las aeropartículas inducirán ROS, existirá un cambio en la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa, lo cual tendrá efecto oxidante en los lípidos y DNA, Tlx un antioxidante disminuirá los efectos inducidos por las PMs.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en células A549 expuestas a PM_{10} de diferentes zonas, el incremento en la generación de ROS, los cambios en el nivel de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa, si existe daño oxidante en lípidos y DNA, y si Tlx previene los daños inducidos por las aeropartículas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener PM₁₀ de la ZUI y ZUC de la CM (2004-2005).
- Evaluar en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀, durante 24 h:
 - La citotoxicidad de las PM₁₀ de la ZUI y ZUC, mediante cristal violeta.
 - La generación de ROS mediante la técnica de DCFH-DA.
 - Los niveles de expresión de las proteínas SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa por inmunoreconocimiento (WB).
 - Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD total y catalasa, por una cinética enzimática.
 - La lípoperoxidación por el contenido de MDA.
 - La formación de aductos de 8-oxoguanina (8-oxoG) mediante un anticuerpo específico.
- Realizar experimentos en paralelo para cada evaluación utilizando 10 µM de Tlx, para evaluar la participación de ROS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de PM₁₀

Las PM₁₀ fueron colectadas con muestreadores de alto volumen (Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA GV 16-H/BL) durante períodos de 24 hrs (1.13 m³/min) (Fig. 9), ubicados en estaciones de la Red de Monitoreo Ambiental Automatizado; Estación Xalostoc en el norte (ZUI) y Estación Merced en el centro (ZUC) de la CM. Se utilizaron filtros de nitrocelulosa (poro de 3.0 µm, Sartorius). Los muestreos se hicieron 5 días por semana y se realizaron en la época de secas en el periodo de Octubre 2004 a Mayo 2005. Los filtros se mantuvieron a 4°C hasta el momento de recuperar las partículas. Las partículas se desprendieron de la membrana mediante un ligero raspado con un cepillo de dientes eléctrico (Oral-B). Las muestras de cada filtro se colocaron y mezclaron dentro de un vial libre de endotoxinas a lo largo del periodo y se almacenaron a 4°C en un desecador. Antes de utilizar las PM₁₀ se esterilizaron en una autoclave (Hyarayama) a 15 libras de presión y 121°C de temperatura durante 15 min. Las PM₁₀ se trabajaron en una dilución stock de 1 mg/mL en medio de cultivo F-12K (Gibco 21127-022).



Figura 9.- Muestreador de alto volumen para PM₁₀.

Cultivo celular

Para este trabajo se utilizó la línea celular de epitelio alveolar humano A549 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en botellas de 75 cm² (Corning 4306641) con medio de cultivo F-12K (Gibco 21127-022) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco 16000-044), se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ (Nuair CF autoflow) hasta que llegaron a confluencia.

Exposición de células a PM₁₀

Las células fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ de las dos zonas durante 24 h, en todos los experimentos. La exposición de partículas se llevó a cabo en medio libre de suero ya que el suero contiene diferentes compuestos que actúan como quelantes de metales, lo que podría influir en nuestros resultados, inhibiendo la generación de ROS (Okeson, *et al.*, 2004).

Para evaluar la participación de ROS en los efectos inducidos por las partículas, para todas las evaluaciones se realizaron experimentos en paralelo donde las células fueron pre-incubadas con 10 μ M de Trolox un secuestrador del radical hidroxilo (Biomol FR-105), 10 min. antes de la exposición a las PM₁₀

Evaluación de viabilidad celular, mediante la técnica de cristal violeta

La viabilidad celular se evaluó midiendo el número de células adheridas teñidas con cristal violeta (Kueng, et al., 1989). Esta técnica se basa en la inclusión del colorante en las células adheridas, es decir las células vivas ya que las células muertas se desprenden del fondo de los pozos. La exposición a PM₁₀ se realizó en placas de 96 pozos con un área de 0.33 cm² (Cornig 3599) con 3.3 x10⁴ células (80% de confluencia). Después de la exposición a las partículas las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4 % (Sigma F-8775) durante 24 h a 4°C, después se lavaron con agua corriente y se agregaron 50 μ l de cristal violeta (Sigma C-3886) al 0.1 % en PBS por pozo durante 10 min. Se retiró el colorante y se agregaron 50 μ l de ácido acético (Laiz 11715) al 33 % durante 10 min. Las células se analizaron en un lector de placas (Genios plus Tecan) a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó comparando la absorbancia de los cultivos expuestos a PM₁₀ con la absorbancia de los cultivos no expuestos. Los resultados se reportan en porcentaje de viabilidad con respecto al control.

Especies reactivas de oxígeno intracelulares

El nivel intracelular de ROS fue medido con 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), evaluando el cambio en la fluorescencia que se da cuando esta molécula es oxidada. Cuando el DCFH-DA es incorporado a la célula, el grupo acetato es cortado por esterasas resultando en una molécula no fluorescente (DCFH), posteriormente DCFH es oxidada por ROS intracelular resultando 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF) que es la molécula fluorescente (LeBel, *et al.*, 1992). Los experimentos se realizaron en placas de 96 pozos con área de 0.33 cm² (Corning 3599) con 3.3 x10⁴ células (80% de confluencia). Las células expuestas a PM₁₀ fueron pre-incubadas con 10 μM de DCFH-DA (Sigma D-6883) en medio F12-K (Gibco 21127-022) durante 30 min a 37°C, (técnica modificada por Konstantin, *et al.*, 2000). La generación de ROS se midió fluorométricamente con un filtro de excitación de 480 nm y otro de emisión de 515 nm utilizando un lector de placas (Genios plus Tecan).

Inmunodetección de SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa por western blot.

El inmunoreconocimiento de proteínas se llevo acabo mediante Western blot. La exposición a PM₁₀ se realizó en placas de 6 pozos con un área de 10 cm² (Nunc 152795) con 1 x10⁶ células (80% de confluencia). Los lísados totales se obtuvieron con buffer de lisis T-NP-NA (Tris 20 mM, pH 8.0, NP-40 1% y NaCl 150 mM) con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche 1206-893) y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso. La cuantificación de la proteína se realizó mediante la técnica de ácido bicinoninico (Smith, *et al.*, 1995). Se separaron electroforéticamente 25 µg de proteína en geles prehechos de gradientes de 10% a 20% de acrilamida (Bio- Rad 161-1106), en un módulo de electroforesis (Bio- Rad Mini Protean 3 cell) con buffer de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH. 8.3), aproximadamente por 1:30 h a 170 Volts (Bio-Rad Power Supply 1000/500). Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham RPN303D) con tamaño de poro 0.45 µm, utilizando una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Trans-Blot SD) con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3), durante 45 minutos a 12 Volts. Se verificó la transferencia y similitud de carga entre los diferentes carriles, tiñendo la membrana con una dilución 1:10 de rojo Ponceau (Sigma p-7170). La membrana se bloqueó durante 1 h con PBS + 5 % de leche Nestle Svelty, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo a proteínas, el bloqueo duro una hora en agitación constante (agitador Lab-line Mod. 4635) a

temperatura ambiente. El inmunoreconocimiento de SOD-Mn se realizó incubando la membrana con el anticuerpo policlonal anti-SOD-Mn (Stress Gen SOD-111) en una dilución 1:5000, para SOD Cu/Zn se utilizó una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal (Stress Gen SOD-101), para catalasa se utilizó anticuerpo policlonal (Calbiochem 219010) usando una dilución 1:2000. Como control interno de carga se uso actina, utilizando para detectarla un anticuerpo primario monoclonal de cerebro de rata amablemente donado por el Dr. Manuel Hernández (Cinvestav-IPN), que fue utilizado en una dilución 1:100. Las condiciones de incubación y lavados para los cuatro anticuerpos fueron las mismas: se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y después de esta incubación las membranas se lavaron tres veces durante 10 min. con PBS Tween 0.05%.

La reacción de inmunoreconocimiento se detectó utilizando como anticuerpo secundario IgGs de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham NXA934) para las proteína SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa, éste anticuerpo se utilizó diluido 1:1000, incubándolo durante 1 h a temperatura ambiente, para actina se incubó el anticuerpo secundario de IgGs de ratón acoplada a HRP (Amersham NXA 931) en una dilución 1:2000. El revelado de la inmunoreacción se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL-PLUS (Amersham RPN 2132).

Actividad de SOD total y catalasa

La actividad de ambas enzimas se determinó realizando una cinética enzimática.

La actividad de SOD total se midió con un kit comercial (Calbiochem 574600). Este kit utiliza una sal de tetrasolio para la detección de radicales superóxido generados por xantinas e hipoxantia. Una unidad de SOD es definida como la suma necesaria para mostrar el 50% de la destrucción del radical superóxido. Se expusieron 1×10^6 células en placas de 6 pozos, con un área de 1 cm^2 (Nunc 1527-022), los lisados celulares se obtuvieron con un reactivo de extracción proporcionado en el kit que consiste de etanol absoluto/cloroformo. Los lisados se guardaron a -70°C hasta su uso. Se utilizaron $20 \mu\text{g}$ de proteína y se añadió la solución amortiguadora (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 50 mM, conteniendo 3.3 mM de ácido bórico y 0.11 mM DTPA, pH= 8.8), se agregó el reactivo 2 (1,4,6-trimetil-2-vinilpiridina trifluorometasulfonato, 33.3 mM, en 1mM de HCl) y se incubó durante 1 min a 37°C , se agrego el reactivo 1 (5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxybenzofluoreno, 0.66 mM, en 3.2 mM de HCl conteniendo 0.5 mM de ácido dietilentriamina pentacético DTPA y 25% etanol), enseguida se leyó durante 1 min, en un espectrofotómetro (Beckman DU® 650) a 525 nm. Para determinar la relación de unidades de SOD y el tiempo de reacción enzimática se realizó una prueba de cuatro blancos. Los resultados se reportan en unidades de SOD/mg de proteína.

La actividad de catalasa se realizó según Beers, 1952, donde se midió la degradación de H_2O_2 en H_2O por la enzima catalasa, se llevo acabo la exposición de células a PM_{10} en placas de 6 pozos (Nunc 152795) con 1×10^6 células, y se obtuvieron lisados totales utilizando buffer de lisis (Tritón 1%, 0.1 M Na_2HPO_4). La actividad de catalasa se evaluó utilizando 20 μg de proteína en 100 μL y se ajustó a 3 mL con buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 a 25 °C, como substrato para la catalasa se agregó H_2O_2 [0.033 %]. Se midió el tiempo en el cual disminuyó la lectura de 0.550 a 0.520 a una absorbancia de 240 nm en un espectofotómetro (Beckman DU® 650), esto debido a la degradación de H_2O_2 . Como control se utilizaron 50 unidades de catalasa (Sigma EC 1.11.1.6). Los datos se presentan como la relación de unidades de actividad por microgramo de proteína.

Evaluación de lipoperoxidación

La evaluación de lipoperoxidación se realizó midiendo el contenido celular de malondialdehído (MDA), los lípidos más susceptibles a los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados. Esta prueba fue evaluada con el kit para MDA (Calbiochem 437634) se midió hidroperóxido lipídico directamente utilizando una reacción redox, con iones ferrosos. Los hidroperóxidos son muy inestables y reaccionan fácilmente con iones ferrosos y produce iones ferricos. El resultado de los iones ferricos es detectado usando un cromógeno como el ion tiosinato. Se emplearon cultivos con un 80% de confluencia en botellas de 25 cm² con una densidad celular de 2x10⁶ (Nunc 163371) después de la exposición a PM₁₀, se obtuvieron los lisados totales con buffer de lisis sin detergente (20 mM de Tris pH 8.0 y 150 mM de NaCl). Se guardaron a -70 °C hasta su uso. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (Smith *et al*, 1995). La evaluación de MDA se realizó utilizando 150 µg de proteína a la cual se le adiciono el reactivo 1 (N-metil 2 fenilindol acetonitrilo), después se adiciono el reactivo 2 (ácido metasulfónico), se mezclaron y se incubaron a 45° C durante 1 h. Las muestras se enfriaron en hielo y se leyeron en una placa de cuarzo de 96 pozos (Hellma 730-009QG) midiendo la absorbancia a 580 nm. La concentración de MDA se determinó con una curva estándar de MDA, proporcionada en el kit. Los valores fueron normalizados con el contenido de proteína y reportados como micromolar (µM) de MDA por mg de proteína.

Evaluación de daño al DNA mediante la formación de aductos de 8-oxoguanina, analizados por microscopia de fluorescencia

La detección de daño a DNA por estrés oxidante se hizo mediante la evaluación de aductos de 8-oxoguanina, utilizando un kit comercial (Calbiochem 500095) que contiene una sonda fluorescente que detecta estos aductos. Los experimentos se realizaron en cámaras de cultivo de 8 pozos con área de 0.81 cm² (Nunc 177402) se expusieron 5 000 células a las partículas y las células se fijaron con formaldehído al 4% (Sigma F-8775) durante 15 min en hielo, se removió el fijador con solución de lavado proporcionada en el kit (55 ml de buffer 25X Tris-salino/TBST tween 20, conteniendo timerosal). Posteriormente las células se deshidrataron con metanol (70 %y 90%), las células se permeabilizaron con metanol al 99% durante 30 min, transcurrido el tiempo las células se rehidrataron con metanol al 95 % seguido de metanol al 70 %, se lavaron brevemente (solución de lavado) y se bloqueó con la solución de bloqueo (componentes de la solución no especificados) durante 1 h a 37°C, posteriormente se lavó y se incubó toda la noche a 4° C con proteína de unión a 8-oxoguanina (FITC-Conjugado timerosal), se lavó 5 veces con solución de lavado y agua destilada, se dejaron secar y se adicionó el medio de montaje con conservador de fluorescencia (Invitrogen P-36935), se colocó un cubre objetos y se dejó secar a temperatura ambiente, en la oscuridad durante 24 h. Los aductos de 8-oxoguanina se analizaron a la vista de tres observadores con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40) a una amplificación de 400x

con un filtro para FITC, a la vista de tres observadores se determinó cualitativamente el daño oxidante mediante la intensidad de fluorescencia, la imagen se capturó con una cámara Nikon Coolpix 4500 y se editaron en el programa Photoshop.

Análisis estadístico

En todos los experimentos las pruebas se realizaron al menos por triplicado y fueron experimentos independientes, los datos se presentan como el promedio de los tres experimentos con su desviación estándar. Para determinar la significancia estadística se utilizó la prueba de “t” de student. Se consideraron datos significativamente diferentes con una $p < 0.05$.

Presentación de las figuras

Las figuras presentadas en la sección de resultados no se muestra el control con Tlx, se muestran solo el control (Ct), ya que son parecidos.

RESULTADOS

Evaluación de la viabilidad celular

Para determinar si $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} tenían algún efecto citotóxico en las condiciones experimentales que se siguieron en este trabajo, se evaluó la viabilidad celular mediante cristal violeta. En la figura 10 se puede observar que $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de las dos zonas no tienen efecto citotóxico significativo. También se evaluó el efecto de $10 \mu\text{M}$ de Tlx y tampoco hubo efecto.

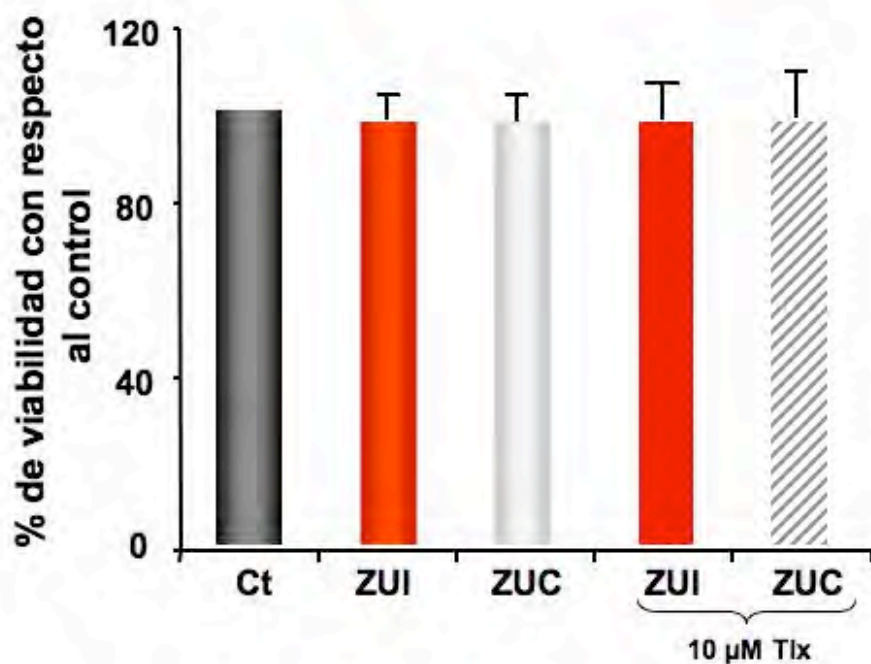


Figura 10.-**Viabilidad celular.** La viabilidad celular se evaluó en células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZUI y ZUC, mediante la técnica de cristal violeta, la concentración utilizada de PM_{10} no tuvo un efecto citotóxico y no se observaron diferencias entre zonas, $10 \mu\text{M}$ de Tlx tampoco fue citotóxico.

Evaluación del incremento en la generación de ROS

Debido que uno de los mecanismos de daño mediante el cual las PM inducen es mediante la generación de ROS, en este estudio se evaluó si las PM₁₀ utilizadas eran capaces de inducir el incremento en la generación de ROS.

Se observó que las aeropartículas de ambas zonas fueron capaces de inducir la formación de ROS comparado con células sin exponer, las PM₁₀ provenientes de la ZUI indujeron 1.5 veces más la generación de ROS en contraste las PM₁₀ del la ZUC indujeron 2 veces más este incremento y la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al control para ambas zonas (ZUI $p=0.0080$, ZUC $p =0.0111$) Cuando las células fueron preincubadas con Tlx la generación de ROS disminuyó considerablemente y esta disminución fue significativa (ZUI $p=0.0002$, ZUC $p=0.0021$) (Fig. 11).

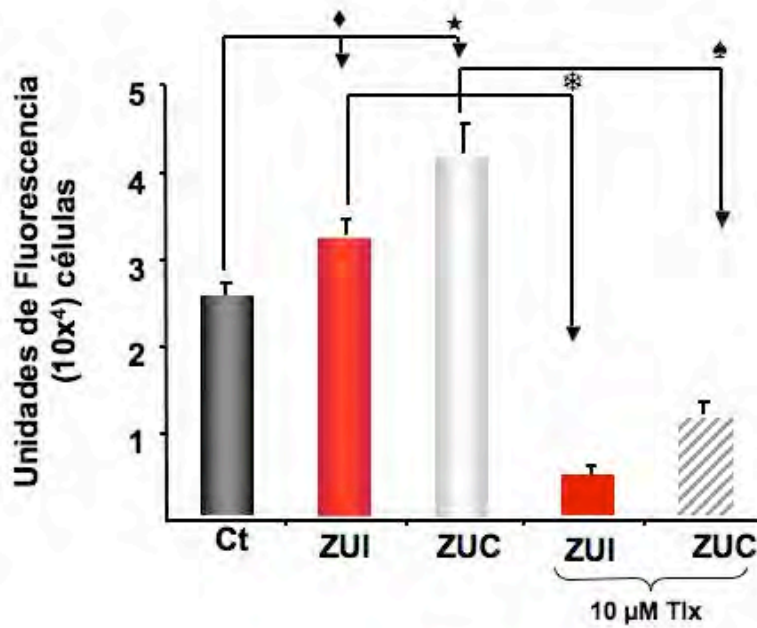


Figura 11.- **Evaluación del incremento de ROS en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZUI y ZUC:** La evaluación de ROS se realizó mediante fluorescencia con DCFH-DA, se observó que ambas zonas fueron capaces de generar ROS, siendo más evidente esta generación con las PM_{10} de la ZUC. (ZUI p= ♦0.0111, ZUC p= ★0.0080), con el antioxidante Tlx se observó una disminución en la generación de ROS (ZUI p= *0.0002, ZUC p= ♣0.0021).

Evaluación de la expresión y actividad enzimática de las proteínas

SOD-Mn SOD Cu/Zn y catalasa

Ante el estrés oxidante la célula tiene mecanismos de defensa como son las enzimas antioxidantes. Para determinar la respuesta antioxidante ocurrida en las células ante la presencia de ROS generadas al ser expuestas a las PM₁₀ del N y C, se evaluó la expresión y actividad enzimática de SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa.

El nivel de expresión de las proteínas SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa se realizó mediante western blot, se determinó que SOD-Mn mantiene su expresión sin cambio, cuando las células fueron expuestas a partículas de ambas zonas. Para SOD Cu/Zn se observó una débil disminución en la expresión, cuando las células fueron expuestas a PM₁₀ de la ZUC, la expresión de catalasa se observó sin cambios para ambas zonas (Fig. 12 **a**). Cuando se evaluó el efecto del antioxidante Tlx en la expresión de las proteínas no se observaron cambios en SOD-Mn, en SOD Cu/Zn se observó una ligera recuperación y en catalasa se mantuvo el mismo nivel de expresión (Fig. 12 **a**).

La actividad de las proteínas SOD-Mn y SOD Cu/Zn se evaluó con una cinética enzimática midiendo la actividad de ambas SOD, siendo el resultado la suma de ambas proteínas (SOD total), se detectó que en células expuestas a partículas de la ZUI la actividad es mayor, aumentando 1.5

veces más, en comparación con las células expuestas a partículas de la ZUC se observó que disminuyó casi el doble de su actividad con respecto al control y estos resultados fueron estadísticamente significativos (ZUI $p= \blacklozenge 0.0544$ ZUC $p= \blackstar 0.0008$). La actividad de SOD total no dependió del estrés oxidante, ya que Tlx no cambió la actividad en estas proteínas (Fig. 12 **b**).

La actividad enzimática de catalasa se evaluó con una cinética y se observó una disminución en células expuestas a PM_{10} de ambas zonas, existiendo una disminución de 0.5 veces para las células expuestas a PMs de la ZUI, y el doble de veces con respecto al control de disminución en la actividad en las células expuestas a partículas de la ZUC estas diferencias fueron significativas (ZUI $p= \blacklozenge 0.0422$, ZUC $p= \blackstar 0.0082$).

La recuperación de la actividad enzimática de catalasa, relacionado al estrés oxidante no se evidenció, contrario a esto, cuando las células se preincubaron con Tlx hubo una disminución en la actividad de ésta proteína, que la observada solo con las partículas (ZUI $p= \blackasterisk 0.005$, ZUC $p= \blackspade 0.0149$) (Fig 12 **c**).

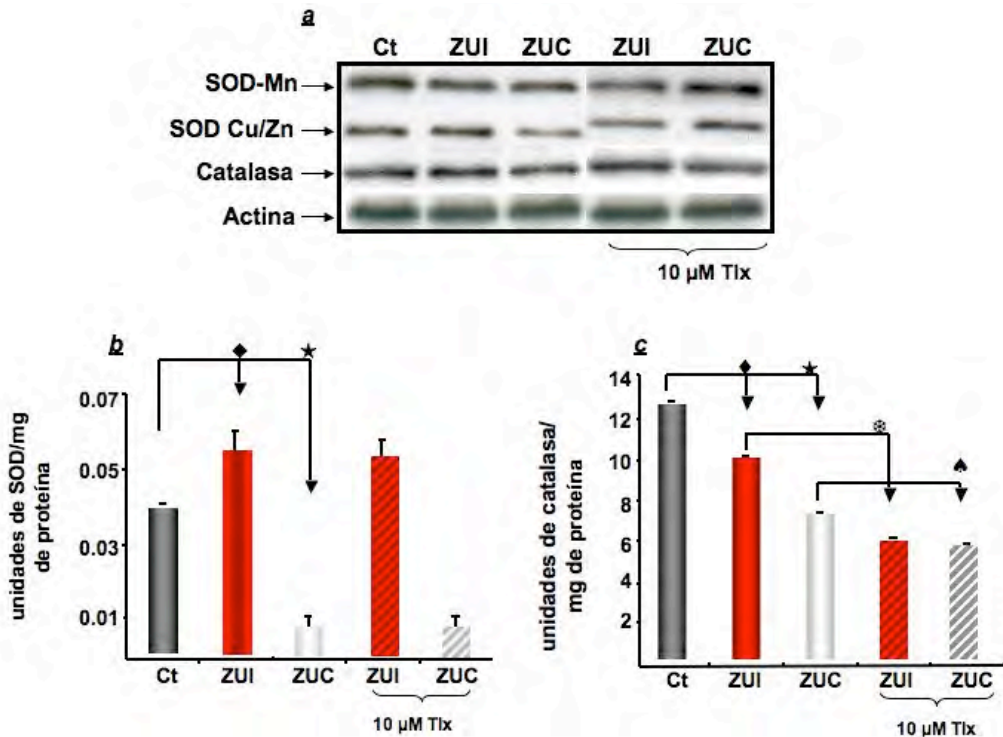


Figura 12.- **Niveles de expresión y actividad enzimática de SOD y catalasa**, células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZUI y ZUC. **(a)** La expresión de SOD total y catalasa se evaluó mediante Western blot y se observó que los niveles de SOD-Mn y catalasa no se ven modificadas pero el nivel de la proteína SOD Cu/Zn disminuyó con las PM_{10} del ZUC, y se observó una recuperación de SOD Cu/Zn con el antioxidante Tlx en las otras enzimas no se observaron cambios en la expresión.

La actividad enzimática de SOD y catalasa se evaluó mediante una cinética enzimática. **(b)** La actividad de SOD total. Se detectó un aumento en la actividad con la ZUI y una disminución en células expuestas a partículas de la ZUC (ZUI $p = \blacklozenge 0.0544$ ZUC $p = \blackstar 0.0088$). **(c)** La actividad de catalasa se vio disminuida con partículas de ambas zonas (ZUI $p = \blacklozenge 0.0422$ ZUC $p = \blackstar 0.0082$). No fue dependiente del estrés oxidante (ZUI $p = \blackstar 0.005$ ZUC $p = \blackspade 0.0149$).

Daño oxidante a Lípidos y DNA

Siendo los lípidos uno de los blancos moleculares de las ROS; se evaluó si las ROS generadas por las PM_{10} tenían como consecuencia la lipoperoxidación, cuantificando el contenido de MDA producto del daño oxidante. Las PMs inducen lipoperoxidación, en la figura 13 **a** se observa que comparado con el control las partículas provenientes de la ambas zonas inducen daño a lípidos, siendo 1.7 veces más con respecto al control, para las células expuestas a las aeropartículas de la ZUI y 2.7 veces más la formación de MDA en células expuestas a PM_{10} de la ZUC, y fue estadísticamente significativo este daño (ZUI $p=0.0013$, ZUC $p=0.0009$). El daño fue dependiente del estrés oxidante (ZUC $p=0.0098$).

Otro hecho por el cual se puede evidenciar el daño oxidante es mediante la presencia de aductos de 8-oxoguanina (8-oxoG) en el DNA, este indicador es consecuencia de la generación de radicales libres de oxígeno y principalmente $OH\cdot$; si estos aductos no son eliminados, son potencialmente mutagénicos. Para evaluar la presencia de aductos de 8-oxoG en células expuestas a PM_{10} de la ZUI y ZUC se realizó con un ensayo cualitativo de fluorescencia, a la vista de tres observadores se determinó que ambas zonas fueron capaces de inducir dichos aductos, sin embargo la células expuestas a la ZUC presentaron mayor evidencia en la inducción de aductos de 8-oxo-G, este daño fue dependiente del estrés oxidante (Fig. 13 **b**).

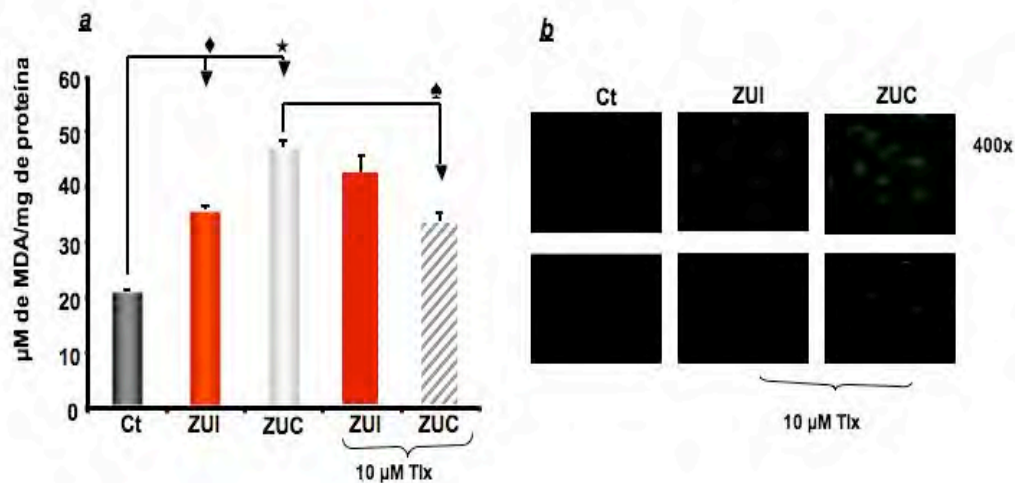


Figura 13.- **Evaluación del daño oxidante en células A549 expuestas 24 h a $10\mu\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZUI y ZUC:** **(a)** La inducción de lipoperoxidación se determinó con la cuantificación de MDA y se observó daño diferencial ZUI<ZUC (ZUI p= \blacklozenge 0.0013 ZUC p= \blackstar 0.0009), el daño fue dependiente del estrés oxidante solo con la ZUC (ZUC pv= \blackspade 0.0098). **(b)** La generación de aductos de 8-oxoG se evidenció cualitativamente siendo diferencial ZUI<ZUC la generación de estos aductos fue dependiente del estrés oxidante en ambas zonas.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el incremento en la generación de ROS, la inducción de cambios en el nivel de expresión y la actividad de enzimas antioxidantes SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa así como el daño a lípidos y DNA, inducidos por las PM₁₀ con diferente composición, y se utilizó Tlx para comprobar la participación de ROS y se encontró que las PM₁₀ inducen de manera diferencial, el aumento en los niveles de ROS (ZUI<ZUC). El nivel de expresión para las proteínas SOD-Mn y catalasa se mantuvo sin cambios para ambas zonas, pero para la proteína SOD Cu/Zn, mostró una disminución solo con las partículas de la ZUC; también se detectaron cambios en la actividad de SOD total, donde la ZUI indujo una mayor actividad con respecto al control y las partículas de la ZUC la disminuyeron con respecto al control. La actividad de catalasa, fue disminuida por las aeropartículas de ambas zonas, siendo la ZUC quien indujo una mayor disminución en la actividad, estos eventos tuvieron consecuencias oxidantes en biomoléculas como la lípidos siendo mayor la producción de MDA con las PM₁₀ provenientes de la ZUC y la formación de aductos de 8-oxoG en DNA, fue inducido por ambas zonas, pero la ZUC indujo una mayor formación de estos.

Cuando se utilizó Tlx, disminuyó la generación de ROS, también se observó que disminuyó la lipoperoxidación en células expuestas a partículas de la ZUC, de igual manera los efectos de la formación de aductos en DNA fueron disminuidos. Es relevante señalar que la disminución en la actividad de SOD

total con las PM₁₀ de la ZUC y la actividad de catalasa para ambas zonas, Tlx no impidió la inhibición de la actividad de estas enzimas por lo tanto la actividad de las enzimas no fue dependiente de ROS.

En los últimos años estudios epidemiológicos y toxicológicos han demostrado que las PM representan un factor de riesgo para la salud de la población (Kapos, *et al.*, 2004, Vineis, *et al.*, 2006). Sin embargo existe poca integración entre estos estudios, aunque han coincidido en una hipótesis ligada a la generación de estrés oxidante ocasionada por los componentes de las aeropartículas (Brown, *et al.*, 2007, Dick, *et al.*, 2003, Donalson, *et al.*, 2003, Kampa, *et al.*, 2007) aun así los mecanismos celulares para la inducción del daño no están del todo esclarecidos.

Se ha propuesto que dentro de las aeropartículas existen compuestos como los metales de transición (Ntziachristos, *et al.*, 2007) y endotoxina ligados a procesos de inflamación (Alfaro-Moreno, *et al.*, 2002, London, *et al.*, 2007, Rosas, *et al.*, 2007, Rosas, *et al.*, 1994) y estos eventos se han relacionado con el incremento en la generación de ROS (Lee, *et al.*, 2006, Liu, *et al.*, 2007).

Las aeropartículas utilizadas en este trabajo contienen metales como Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, Cr, V y Ti, estos se encontraron de forma más abundante en la ZUI, a excepción de Cu que fue mayor en la ZUC. El otro componente evaluado fue el contenido de endotoxina y se encontró que la mayor concentración la tuvieron las partículas provenientes de la ZUC (Sanchez-

Pérez, *et al.*, en preparación). El incremento en la generación de ROS fue inducido por ambas zonas y la relación fue: ZUI<ZUC. Estos resultados mostraron que no existió una relación directa entre el contenido de metales y el incremento de ROS, de tal forma que la generación diferencial de ROS podría ser explicada por el contenido de endotoxina ya que la ZUI presenta una menor concentración de endotoxina en comparación con la ZUC.

Si bien el contenido de endotoxina y de metales participan en la generación de ROS, no dejamos de considerar otros componentes tanto orgánicos (PAH's, sulfatos) como inorgánicos (no evaluados), que son inductores de ROS,(Brown, *et al.*, 2007, Dick, *et al.*, 2003, Gutiérrez-Castillo, *et al.*, 2006), que podrían estar participando en este incremento. Debido a que los niveles de especies reactivas de oxígeno fueron disminuidos con el antioxidante Tlx (un secuestrador de radicales OH[•]) esto nos da un indicio de que uno de los radicales más generados por las partículas es justamente el OH[•]. Con estos resultados corroboramos que las aeropartículas inducen la generación de ROS.

Uno de los mecanismos de defensa celular ante daño oxidante es mediante las enzimas encargadas del manejo adecuado de las especies reactivas de oxígeno, en este trabajo se evaluó el nivel de expresión y la actividad de las enzimas SOD-Mn, SOD Cu/Zn y catalasa.

Las aeropartículas no inducen cambios en el nivel de expresión de las enzimas SOD-Mn y catalasa, pero en SOD Cu/Zn hubo diferencias. Si bien

solo la proteína SOD Cu/Zn presento cambios, lo relevante es señalar que existieron diferencias en la actividad de estas enzimas.

Se descubrió que la actividad de SOD total fue incrementada en células expuestas a PM₁₀ de la ZUI, y las PM₁₀ de la ZUC, inhibieron su actividad de manera considerable. Un mecanismo probable por el cual puede existir la inhibición de SOD total, es como lo menciono O'maller y colaboradores (2004), dónde la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes es consecuencia de un ambiente prooxidante, pero nuestros resultados no apoyan este hecho, ya que al evaluar la actividad con un antioxidante no se observaron cambios, para ninguna de las zonas. En contraste estas diferencias en la actividad pueden deberse a otros niveles de alteración, un mecanismo posible es el de la interacción directa de los componentes de las aeropartículas con los sitios activos de las proteínas antioxidantes ya que se sabe que, algunos metales pueden interactuar con los sitios de unión a metales como en la proteína SOD Cu/Zn, (Stadtman, *et al.*, 1990).

Un estudio *in vitro* con partículas realizado por Hatzis y colaboradores en (2006), reportaron la disminución en la actividad de SOD-Mn y SOD Cu/Zn. Cuando estos autores utilizaron partículas altamente tóxicas (alto contenido de metales) partículas de moderada toxicidad (metales, silicatos y sulfatos), y partículas de baja toxicidad (principalmente componentes de sílice), observaron que la actividad de las enzimas disminuyó y se encontró una relación con la toxicidad de las partículas utilizadas, por lo que se especula que las enzimas que presentan sitios de unión a metales son vulnerables a

interactuar con los metales contenidos en las partículas y de esta manera inhibir o alterar la actividad

También evaluamos la actividad de catalasa donde se encontró disminución en células expuestas a partículas de ambas zonas, siendo más evidente la disminución con las aeropartículas de la ZUC. O'maller y colaboradores (2004). También reportaron que en condiciones de estrés oxidante puede existir una disminución en la modulación de la actividad redox de esta enzima, nuestras evidencias no mostraron una asociación dependiente de la condición oxidante, por lo cual también proponemos otros mecanismos de alteración inducidos por las aeropartículas en esta proteína, que estén participando en la inhibición de la actividad, como lo propuesto para SOD.

La diferencia destacable en la evaluación de actividad enzimática fue la inducción de cambios diferenciales entre ambas zonas, donde la ZUI incremento la actividad de SOD total y la ZUC la disminuyo, este resultado es relevante ya que el estrés oxidante inducido por las aeropartículas puede ser manejado de manera diferencial; por lo tanto las células responden de manera diferente.

Los resultados anteriores del nivel de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes en células expuestas a PM_{10} no se han reportado hasta el momento, interesantemente se encontró que las PM_{10} de la ZUI aumentan la actividad de SOD y las PM_{10} de la ZUC la disminuyeron, por lo que el presente estudio es el primero en evidenciar los cambios en expresión y

actividad de SOD y catalasa inducidos por aeropartículas de composición diferente en células, abriendo un panorama de investigación hacia los mecanismos de acción que tienen los componentes presentes en las aeropartículas, que inducen diversas consecuencias

Ante el incremento de ROS y los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes se puede generar un ambiente prooxidante favorable para inducir daño por lo que se evaluaron dos blancos moleculares susceptibles al daño oxidante, uno de estos blancos fueron los lípidos y se observó que tanto la ZUI como la ZUC fueron capaces de inducir lipoperoxidación, siendo más evidente este daño con la ZUC. La consecuencia de la lipoperoxidación es que puede alterar las funciones de la membrana como la selectividad, por otro lado los productos generados por la lipoperoxidación como MDA son altamente mutágenos (Muniz, *et al.*, 2008).

La lipoperoxidación inducida por las PM₁₀ de la ZUI no disminuyó con Tlx a las 24 h de evaluación por lo que sería importante realizar ensayos posteriores a este tiempo para ver si existe una disminución en lipoperoxidación.

Por ser una biomolécula de vital importancia y un blanco susceptible al daño oxidante se evaluó cualitativamente la formación de aductos 8-oxoG en DNA, esta formación de aductos fue inducida por ambas zonas, siendo la ZUC la que indujo una mayor formación de estos. El daño inducido con las aeropartículas muestra una parte de la potencial toxicidad de las mismas ya

que si estos aductos, consecuencia de la exposición a las PM₁₀, no son reparados adecuadamente pueden existir mutaciones que alteren diversas funciones celulares, y disparar una serie de patologías graves (Balásházy, *et al.*, 2003, Fruehuaf, *et al.*, 2007 Leonard, *et al.*, 2004). La generación de especies reactivas promovió el daño oxidante y estos efectos fueron disminuidos con el antioxidante.

La lipoperoxidación y la formación de aductos de 8-oxoG, probablemente es consecuencia de la limitación enzimática para el manejo de las ROS, ya que las células expuestas a partículas de la ZUC inhibieron la actividad tanto de SOD total, como la de catalasa, consecuentemente observamos que esta zona indujo mayores efectos en las macromoléculas evaluadas, en contraste la ZUI indujo la actividad de SOD total y se observó un daño oxidante menor.

Estas evidencias nos llevan a considerar que las PM son capaces de inducir estrés y daño oxidante, y que el efecto es diferente dependiendo de la zona de colecta en este caso en particular (ZUI < ZUC). Este trabajo por primera vez evidencia en células cambios en las enzimas encargadas del manejo de las ROS. Estos cambios no fueron dependientes del estrés oxidante y fueron diferentes dependiendo de la procedencia de las aeropartículas. Esto apoya lo que en nuestro grupo de trabajo se ha manejado: que la composición de las aeropartículas juega un papel importante en los efectos inducidos por las mismas. (Alfaro-Moreno, *et al.*, 2002, García-Cuellar, *et al.*, 2002, Osornio-Vargas, *et al.*, 2003, Rosas, *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

1. Las PM_{10} inducen incremento de ROS de manera diferencial ZUI<ZUC.
2. La expresión enzimática de SOD-Mn y catalasa se mantuvieron sin cambios para ambas zonas, mientras que SOD Cu/Zn disminuyó al exponer las células a partículas de la ZUC.
3. La actividad de SOD total, aumenta con las aeropartículas de la ZUI y disminuye con la ZUC.
4. La actividad de catalasa disminuye con aeropartículas de ambas zonas.
5. La lipoperoxidación fue diferencial siendo la relación: ZUI<ZUC.
6. La formación de aductos 8-oxoG, fue inducida por ambas zonas, la ZUC indujo una mayor formación de aductos.
7. Los efectos que están dados por ROS fueron el daño a lípidos y DNA ya que cuando se utilizó Tlx disminuyeron los efectos, pero en la actividad no se encontró esta relación.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudios que nos permitan identificar con mayor precisión la co-participación de otros componentes de las PMs, cuyo mecanismo de acción contribuya al efecto en la disminución de las enzimas antioxidantes.
- Evaluar el nivel de expresión y actividad de GPX y GHSS, para concluir el mecanismo celular antioxidante, mediado por enzimas.
- Evaluar el daño oxidante a proteínas, ya que esta evaluación podría evidenciar si las proteínas encargadas del manejo del estrés oxidante se alteran.
- Efectuar experimentos dónde se evalúen proteínas de reparación de daño al DNA.

Anexo 1

Especies Reactivas de Oxígeno

Los términos “especies reactivas de oxígeno” y “radicales libres de oxígeno” designan a las formas del oxígeno que son más reactivas que el oxígeno molecular en su estado basal. A esta categoría pertenece el oxígeno molecular en su estado de oxígeno singulete O_2^{\cdot} , y las formas parcialmente reducidas de oxígeno: ión superóxido $O_2^{\cdot-}$, hidroperoxilo HO_2^{\cdot} , hidroxilo OH^{\cdot} y péroxido de hidrógeno H_2O_2 .

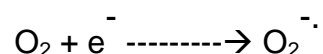
El oxígeno molecular O_2 , posee un electrón en cada uno de sus orbitales externos, esto, aunado a su alta electronegatividad, lo hace muy reactivo. Sin embargo, presenta lo que se llama “restricción de spin”, debido a que sus electrones externos tienen direcciones de spin paralelas, lo que disminuye su capacidad para combinarse con un par de electrones con el arreglo normal de giro en direcciones opuestas.

La reactividad del oxígeno molecular puede incrementarse durante ciertas reacciones en las que se invierte el spin de uno de los electrones externos. Este proceso produce el oxígeno singulete (O_2^{\cdot}), que es altamente reactivo en virtud de que carece de restricciones de spin. Un mecanismo para la formación de oxígeno singulete es la acción de luz en presencia de un fotosensibilizador.

La restricción de spin del oxígeno también desaparece si se abstrae un electrón individual de otra molécula, en lugar de un par, ya que en este caso la inversión de spin no es necesaria. Esta característica es la que hace posible la reducción univalente del oxígeno, que tiene como consecuencia la formación de radicales libres.

Un radical libre es una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más extremo.

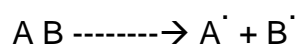
Un compuesto se vuelve radical libre por ganancia de un electrón



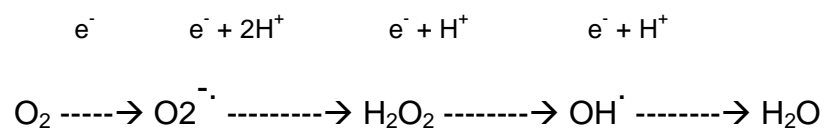
Al perder un electrón,



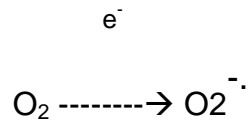
O durante la ruptura homolítica de un enlace covalente



La reducción secuencial univalente del oxígeno molecular produce radicales libres

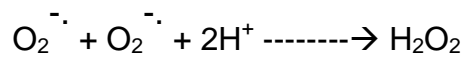


El radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) se produce por la transferencia de un electrón al oxígeno molecular

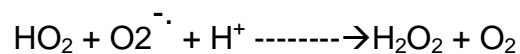
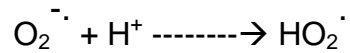


La formación de superóxido también se puede iniciar al exponer oxígeno molecular a electrones de suficiente energía, como la radiación ionizante y otras fuentes.

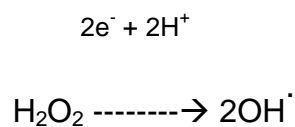
El ión superóxido puede sufrir una reacción de dismutación en donde dos moléculas de superóxido reaccionan para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂)



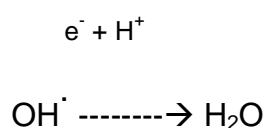
La reacción de dismutación involucra un primer paso en donde se protona el superóxido dando lugar al radical hidroperoxilo (HO₂·)



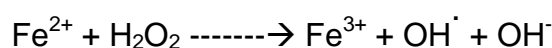
Cuando se transfiere un electrón al peróxido de hidrogeno se forma el altamente reactivo radical hidroxilo (OH·)



Con la adición de otro electrón, el radical hidroxilo se convierte en agua

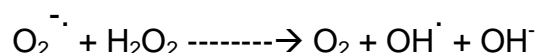


El radical hidroxilo (OH^\cdot) también se forma en la llamada reacción de Fenton, donde el peróxido de hidrógeno interacciona con iones ferrosos o cúpricos.



Y en la reacción tipo Haber-Weiss, catalizada por hierro, en donde el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido interaccionan entre si en presencia de trazas de iones de metales de transición, formando radical hidroxilo, ion hidroxilo y oxígeno.

sal de hierro



La radiación ionizante causa la ruptura heterolítica del agua a átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo. Ciertas longitudes de onda de la luz pueden causar fotólisis de los enlaces químicos y generar radicales libres. Contaminantes atmosféricos como el ozono o los dióxidos de nitrógeno pueden reaccionar con moléculas biológicas para formar radicales

reactivos. También se producen radicales libres en la combustión de materia orgánica, como el humo de fogatas y cigarro.

Formación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos

Las reacciones de formación de radicales pueden llevarse a cabo en cualquier ambiente químico que posea los componentes necesarios, y de este modo tanto el interior de las células como el ambiente extracelular resultan ser adecuados para que ocurra. Por esta razón, las reacciones de formación e interconversión detalladas en la sección anterior son fuentes potenciales de especies reactivas de oxígeno dentro de los sistemas biológicos, y constituyen la manera en la que los cambios ambientales afectan la exposición de la materia viva a radicales libres.

Sin embargo, aunque estas causas externas modulan la exposición a especies reactivas de oxígeno, la fuente más importante de especies reactivas de oxígeno para los organismos vivos es la producción continua dentro del organismo por reacciones de oxido-reducción.

Los radicales libres de oxígeno se forman durante el metabolismo aeróbico normal. Las reacciones redox que ocurren durante el transporte de electrones en los organelos subcelulares o sistemas membranales son responsables de la generación de ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En los eucariontes, de este modo, las mitocondrias, peroxisomas, núcleos,

retículo endoplásmico y membrana plasmática son sitios de formación de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones fisiológicas.

Los dos sitios más importantes de formación de radicales superóxido en mitocondrias son la región de la ubiquinona-citocromo *b* y la flavoproteína NADH deshidrogenasa. Una fuente importante de radical superóxido es la “fuga univalente” en la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Durante la fosforilación oxidativa, la citocromo oxidasa mitocondrial acopla la fosforilación del ADP a la reducción tetravalente controlada del oxígeno para formar agua. En este proceso, los intermediarios parcialmente reducidos normalmente están unidos fuertemente a los sitios activos del sistema enzimático, pero se puede liberar en concentraciones moderadas bajo condiciones fisiológicas, y en cantidades considerables cuando las enzimas son perturbadas con inhibidores, desacoplantes, inductores y pseudosustratos.

Lo mismo sucede en la cadena microsomal de transporte de electrones. Así otra fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno es el retículo endoplásmico, que produce superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno. La NADPH-citocromo *c* (P450) reductasa y el citocromo P450 han sido propuestos como los sitios de generación de O_2 y H_2O_2 .

Los peroxisomas producen peróxido de hidrógeno durante el metabolismo de los ácidos grasos, y en la transformación de glicolato a glioxilato, a través de la enzima glicolato oxidasa.

La membrana nuclear es otra fuente de especies reactivas de oxígeno en la célula. Las especies detectadas son también $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Existe un pigmento autooxidable (con picos a 559,531 y 428 nm) que está involucrado como un aceptor de electrones en la oxidación de NADPH y puede ser la fuente de radicales superóxido. La NADPH-citocromo c reductasa es supuestamente el segundo generador de superóxido.

El sistema NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática de células inflamatorias genera radical superóxido durante el llamado “estallido respiratorio” que es un componente importante en la actividad microbicida de las células inmunes. El complejo enzimático de la NADPH oxidasa ha sido identificado también en otros tipos celulares.

Una gran variedad de enzimas catalizan la reducción univalente de oxígeno molecular a radical superóxido, entre las que se encuentran la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, deshidrogenada dihidroorótica, deshidrogenada de flavinas y peroxidasas.

La reducción univalente del oxígeno también ocurre *in vivo* en reacciones de óxido-reducción no enzimáticas (por ejemplo hidroquinona + $O_2 \rightarrow$ semiquinona + $O_2^{\cdot-} + H^+$) y durante reacciones de autooxidación de catecolaminas, flavinas y ferredoxinas reducidas.

Las reacciones que se han propuesto como formadoras de oxígeno singulete *in vivo* son la reacción de Haber-Weiss catalizada por fierro, la dismutación espontánea de radical superóxido y la oxidación de sales hidrogenadas por

peróxido de hidrógeno como parte de la actividad antimicrobiana de las células inflamatorias.

Anexo 2

Mecanismos antioxidantes

Debido al hecho que los radicales libres están siendo producidos continuamente en pequeñas cantidades por procesos metabólicos normales, todas las células aerobias poseen mecanismos para evitar los efectos de las especies reactivas de oxígeno que se denominan defensas antioxidantes.

La organización estructural de la célula es un importante medio para dificultar las reacciones oxidativas, ya que permite separar las moléculas cuya reacción facilita la producción de radicales libres, como los depósitos de Fe^{2+} y el oxígeno.

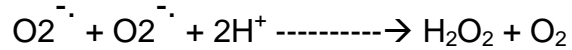
De hecho, las concentraciones intracelulares de moléculas potencialmente formadas de radicales libres se mantienen al mínimo, ya que la citocromo oxidasa mitocondrial consume la mayoría del oxígeno molecular disponible.

Las células contienen también mecanismos enzimáticos específicos para remover radicales libres de oxígeno y sus productos así como sustancias que actúan como “atrapadores” de radicales.

Las distintas formas de superóxido dismutasa en eucariontes (citosólica que contiene Cu/Zn y de matriz mitocondrial, que contiene Mg) aceleran en 10^4 veces la dismutación espontánea del radical superóxido a pH fisiológico. El

metal del sitio activo es reducido por un radical superóxido y reoxidado por un segundo radical superóxido.

SOD

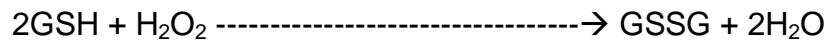


La aceleración de esta reacción asegura que no haya radical superóxido disponible para formar radicales hidroxilo por catálisis de Haber-Weis.

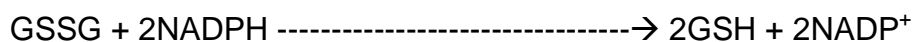
Existen dos sistemas enzimáticos para contender con el peróxido de hidrógeno.

A bajas concentraciones la mayor parte del peróxido de hidrógeno es transformada en agua por las distintas glutatión peroxidasas (la selenoenzima y la que no posee grupo prostético metálico), mediante la conversión de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG). La enzima glutatión reductasa cataliza la regeneración del glutatión reducido usando NADPH proveniente del ciclo de las pentosas.

glutatión peroxidasa

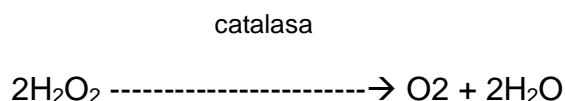


glutatión reductasa



La glutatión peroxidasa cataliza también la reducción de los peróxidos lipídicos, con lo que previene la propagación de la lipoperoxidación.

A concentraciones altas de peróxido de hidrógeno, la catalasa se vuelve la principal responsable de su eliminación.



Los tejidos poseen además una gran variedad de antioxidantes no enzimáticos para prevenir daño por radicales libres. La vitamina E (formada por varios isómeros del tocoferol) es un antioxidante de fase lipídica que se incorpora a las membrana y convierte al radical superóxido, hidroxilo, y radicales lipoperoxilo a formas menos reactivas. Ejerce su reacción donando un hidrógeno al radical con la consecuente formación de un radical de vitamina E que es particularmente estable debido al fenómeno de resonancia entre sus dobles enlaces. Otros compuestos actúa de manera similar. Por ejemplo, la cisterna y la cisteamina (beta-mercaptoetilamina) son capaces de apagar la reactividad de los radicales libres debido a que donan electrones de sus grupos sulfhidrilo. La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante de fase acuosa.

La ceruloplasmina, lactoferrina, transferrina, ácido úrico y albúmina son capaces de unir metales pesados, impidiendo su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

Anexo 3

Efectos sobre moléculas biológicas

Todos los componentes celulares pueden ser blancos potenciales para el ataque por radicales libres: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las reacciones principales incluyen la iniciación de procesos de autooxidación en cadena, reacciones de ramificación, adición de radicales a dobles ligaduras, abstracción de hidrógenos de carbonos alifáticos y oxidación de grupos sulfhidrilo, tioéter y amino.

De este modo, el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno puede producir peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en los organelos y la membrana plasmática, oxidación de enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, carbonización y polimerización de proteínas, despolimerización de polisacáridos, hidroxilación de purinas o pirimidinas, y cortes de cadena sencilla o doble del DNA.

En las proteínas se han identificado los residuos de aminoácidos que son modificados por reacciones oxidativas: metionina, histidina, cisteína, prolina, triptófano, lisina y tirosina.

Sus modificaciones químicas pueden dar lugar a modificaciones estructurales que a su vez desencadenen alteraciones funcionales.

Sin embargo, por mucho el daño mayor, que también ha sido el más extensamente investigado, es a los lípidos de membrana. Como consecuencia de las reacciones de radicales libres, los fosfolípidos y el colesterol sufren cambios químicos que alteran profundamente las propiedades estáticas y dinámicas de la bicapa lipídica. Como la membrana es una unidad en donde todos los componentes están estrictamente interrelacionados y donde los lípidos no sólo juegan un papel de soporte, el daño lipoperoxidativo resulta de importancia biológica.

La lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados es un ejemplo del tipo de reacciones en cadena que pueden ocasionar los radicales libres. Cuando dos radicales reaccionan entre sí, pueden formarse una molécula estable. Este hecho permite explicar las reacciones de terminación de la cadena.

Aunque el radical inicial produce sólo efectos biológicos en sitios distantes de donde se inició el proceso. Los efectos de las especies reactivas de oxígeno dependen fuertemente de la densidad del sistema en el que la reacción tienen lugar. Por ejemplo, la misma tasa de formación de radicales será más eficiente en polimerizar los componentes membranales en un grado mayor que componentes citosólicos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
Ca	Calcio
Cl	Cloro
CM	ciudad de México
CO	Monóxido de carbono
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DNA	Acido desoxirribonucléico
DCFH-DA	2',7'-Diclorofluoresceina diacetato
EDTA	Acido etilen-diamonio-tetra-acético
Fe	Hierro
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
LPX	Lipoperoxidación
MDA	Malon dialdehido
NaCl	Cloruro de Sodio
Mn	Manganeso
Ni	Niquel
NO ₂	Bióxido de nitrogeno
OH·	Radical Hidroxilo
O ₂	Oxigeno molecular
¹ O ₂	Oxigeno singulete
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PBS	Amortiguador de fosfatos
Pb	Plomo
PM	Material particulado
PM ₁₀	Material particulado ≤ a 10 µm
PM _{2.5}	Merial particulado ≤ a 2.5 µm

ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Azufre
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Se	Selenio
SOD - Mn	Superóxido dismutasa manganeso
SOD Cu/ Zn	Superóxido dismutasa Cobre/Zinc
SO - Ec	Superóxido dismutasa extracelular
SO ₂	Bióxido de azufre
Ti	Titanio
Tlx	Trolox (análogo de la vitamina E)
V	Vanadio
Zona Urbano-Comercial	ZUC
Zona Urbano-Industrial	ZCI
Zn	Zinc

BIBLIOGRAFIA

1. Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar CM., Poner JC., Murray JC., Rosas I., Rosales SP., Osornio-Vargas AR (2002). Biologic effects induced in vitro by PM₁₀ from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspectives*. (7) 110:715-20.
2. Alfaro-Moreno E., Nawrot TS., Nemmar A., Nemery B (2007). Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects. *Curr.Opin.Pulm Med*. (13) 2:98-106
3. Balásházy I., Hofmann W., Heistracher T (2003). Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *Journal of Applied Physiology* 94:1719-1725.
4. Balduzzi M (2003). Biological effects of PM₁₀ relevant to human health. *Ann Ist Super Sanita*. (39) 3:411-417.
5. Beers RF Jr., Sizer IW (1952). A spectrophotometric method for measuring the breack down of hidrogen peroxide by catalase. *Journal of biological chemistry*. 195:133-140.
6. Borja V., Loomis D., Banydiwala S., Shy C., Rascón R (1997). Ozone, suspended particles, and daily mortality in México city. *American Journal Epidemiology*. 145:258-268.
7. Borja-Aburto UH., Castillejos M., Gold DR., Bierzwinski S., Loomis D (1998). Mortality and ambient fine particles in south-west México city, 1993-1995. *Environmental Health Perspect*. 106:849-855.

8. Brauer M., Avila-Casado C., Fortoul TI., Vedal S., Stevens B., Churg (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect.* 109:1039-43
9. Brown DM., Hutchison L., Donaldson K., Stone V (2007). The effects of PM₁₀ particles and oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: modulating effects of calcium-signaling antagonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (292) 6:L1444-51.
10. Castillejos M., Borja-Aburto., Dockery D., Gold D., Loomis D (2000). Air borne coarse particulate mortality. *Inhal Toxicol.* (suplemento 1) 12:61-72.
11. Choi JH., Kim JS., Kim YC., Kim YS., Chung NH., Cho MH (2004). Comparative study of PM_{2.5} and PM₁₀ induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *Journal Veterinary Science.* (1) 5:11-8.
12. Delfino RJ., Sioutas C., Malik S (2005). Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect.* (1130) 8:934-46.
13. Dick CA., Brown DM., Donaldson K., Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol.* (15) 1:39-52.
14. Dockery DW., Pope CA., Xu X., Spengler JD., Ware JH., Fay ME., Ferris BG., and Speizer FE (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329:1753-1759.
15. Donaldson K., Brown D, Mitchell C., Dineva M., Beswick P., Gilmour P., MacNee W (1997). Free radical activity of PM₁₀: iron-mediated generation of hidroxy radicals. *Environmental Health Perspectives.* (105) 5:1285-1289.

16. Donalson K., Stone V., Borm P., Jimenez L., Gilmour P., Schins R., Knaapen M., Rahman I., Faux S., Brown D., MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic. Biol. Med.* (34) 11:1369-1382.
17. Englert N (2004). Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters.* 149: 235-242.
18. Evans (2002). Health benefits of air pollution control, en: *Air quality in the México megacity. An integrated assessment.* Molina M y Molina L, editors, kluwer academic publishers. The Netherlands.
19. Fruehuaf JP., Meyskens FL (2007). Reactive oxygen species: A breath of or Death? *Clinic cancer research.* (13) 3:789-794.
20. García-Cuellar CM., Alfaro-Moreno E., Martínez-Romero F., Ponce de León-Rosales S., Rosas I., Pérez-Cárdenas E., Osornio-Vargas AR (2002). DNA damage Induced by PM₁₀ from different zones of México City. *British Occupational Hygiene Society.* (46) 1:425-428.
21. Gauderman WJ., Avol E., Gilliland F., Vora H., Thomas D., Berhane K., McConnell R., Kuenzli N., Lurmann F., Rappaport E., Margolis H., Bates D., and Peter J (2004). The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N. Engl. J. Med.* 351:1057-1067.
22. Gehring U., Heinrich J., Kramer U., Grote V., Hochadel M., Sugiri D., Kraft M., Rauchfuss K., Eberwein HG., Wichmann HE (2006). Long-term exposure to ambient air pollution and cardiopulmonary mortality in women. *Epidemiology.* (17) 5:545-51.

23. Genestra M (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* (19) 9:1807-1819.
24. Guitiérrez-Castillo ME., Roubicek AD., Cebrián-García ME., De Vizcaya-Ruiz A., Sordo-Cedeño M., Ostrosky-Wegman P (2006). Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 47:199-211.
25. Hatzis C., Godleski JJ., González-Flecha B., Wolfson JM., Koutrakis P (2006). Ambient particulate matter exhibits direct inhibitory effects on oxidative stress enzymes. *Environ Sci Technol.* 40:2805-2811.
26. Instituto Nacional de Ecología
http://www.ine.gob.mx/dgicurg/calair/calair/cont_criterio.html
27. Kampa M., Castanas E (2007). Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.*
28. Kappos AD., Bruckmann P., Eikmann T., Englert N., Heinrich U., Hoppe P., Koch E., Krause GH., Kreyling WG., Rauchfuss K., Rombout P., Schulz-Klemp V., Thiel WR., Wichmann HE (2004). Health effects of particles in ambient air. *Int J Hyg Environ Health.* (207) 4:399-407.
29. Karihtala P., Soini Y (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* (115) 2:81-103.
30. Knox EG (2005). Childhood cancers and atmospheric carcinogens. *J Epidemiol Community Health.* (59) 2:101-5.

31. Konstantin S., Weicheng S., Milkhail V. Blagosklonny., Max C (2000). Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive Oxygen species-independent Mechanism. *Cancer Research*. 60:3375-3378.
32. Lagorio S., Forastiere F., Pistelli R., Iavarone I., Michelozzi P., Fano V., Marconi A., Ziemacki G., Ostro BD (2006). Air pollution and lung function among susceptible adult subjects: a panel study. *Environ Health*. (5) 5:11.
33. LeBel CP., Ischiropoulos H., Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol*. 5:227-231.
34. Lee JC., Son YO., Choi KC., Jang YS (2006). Hydrogen peroxide induces apoptosis of BJAB cells due to formation of hydroxyl radicals via intracellular iron-mediated Fenton chemistry in glucose oxidase-mediated oxidative stress. *Mol Cells*. (22)1:21-9.
35. Leonard SS., Bower JJ., Shi X (2004). Metal-induced toxicity and carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol. Cell Biochem*. (255) 1:3-10.
36. Liu L., Ruddy TD., Dalipaj M., Szyszkowicz M., You H., Poon R., Wheeler A., Dales R (2007). Influence of personal exposure to particulate air pollution on cardiovascular physiology and biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with diabetes. *J Occup Environ Med*. (49) 3:258-65.
37. London SJ (2007). Gene-air pollution interactions in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. (4) 3:217-20.

38. Mates JM., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I (1999) a. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* (32) 8:595-603.
39. Mates JM., Sanchez-Jimenez F (1999) b. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* (15) 4:D339-45.
40. Miranda J., Barrera VA., Espinosa AA., Galindo OS., Meinguer J (2005). PIXE análisis of atmospheric aerosols in Mexico City. *X-Ray Spectrometry*, 34:315-319.
41. Miranda J., Crespo L., Morales A (2000). Absolute principal component analysis of atmospheric aerosols in México City. *X-RAY Spectrometry*, 34: 315-319.
42. Muniz JF., McCauley L., Scherer J., Lasareu M., Koshy M., Kow YW., Nazar-Stewart V., Kisby GE (2008). Biomarkes of oxidative stress an DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol.* (227) 1:97-107.
43. Norman R., Cairneros E., Witi J., Bradshaw D., South África comparative risk assessment collaborating grup (2007). Estimating the burden of disease attributable to urban outdoor air pollution in south Africa in 2000. *S. Afr. Med J*, 8: 782-90.
44. Ntziachristos L., Froines JR., Cho AK., Sioutas C (2007). Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol.* 7:4-5.
45. O'Malley YQ., Reszka KJ., Rasmussen GT., Abdalla MY., Denning GM., Britigan BE (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanini inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Journal Physiol Lung Cell Mol.* 285:1077-1086.

46. Okado MA., Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:38388-38393.
47. Okeson CD., Riley MR., Riley-Saxton E (2004). In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicology in vitro.* 18:673-680.
48. O'Malley YQ., Reszka KJ., Spitz DR., Denning GM., Britigan BE (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (287) 1:L94-103.
49. Osornio-Vargas AR., Bonner JC., Alfaro-Moreno E., Martinez L., Garcia-Cuellar C., Ponce-de-Leon Rosales S., Miranda J., Rosas I (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect.* 10:111 289-93.
50. Poljsak B., Raspor P (2007). The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *J Appl Toxicol.*
51. Pope CA., Dockery DW (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *Journal of the air and waste management association.* 56:709-742.
52. Pope CA., Burnett RT., Thun MJ., Calle EE., Krewski D., Ito K., and Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287:1132-1141.

53. Pope CA., Hansen ML., Long RW., Nielsen KR., Eatough NL., Wilson WE., and Eatough DJ (2004). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* 112:339-345.
54. Potter JD (1997). Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett*, 114:7-9.
55. Rimson L., Moller P., Lofth Steffen (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research.* (592) 1-2: 119-37.
56. Rosas I., Ruiz G., Raga G., Miranda J., Oleschko C., Castillejos M., Retama A., Osornio-Vargas AR (2004). Evaluation of the relationship composition- Toxicity of PM₁₀ and PM_{2.5} in three zones of México City, final report to the Comisión ambiental Metropolitana and Massachussets Institute of technology. Universidad Nacional Autónoma de México: México City.
57. Rosas I., Serrano J., Alfaro-Moreno E., Baumgardner D., Garcia-Cuellar C., Miranda J., Raga G., Castillejos M., Drucker Colín R., Osornio-Vargas AR (2007). Relations between PM₁₀ composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere.* 67:1218-28.
58. Rosas I., Yela A., Santos-Burgoa C (1994). Ocurrente of airborne enteric bacteria in México city. *European Journal of aerobiology: aerobiologia* 10: 39-46.
59. Salnikow K., Su W., Mikhail V., Blagosklonny., Costa M (2000). Carcinogenic Metal induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by Reactive Oxygen Species-independent mechanism. *Cancer research.* 60:3375-3378.

60. Sánchez-Pérez Y., Osornio-Vargas AR., Gutiérrez-Ruíz MC., Segura-García Y., Miranda Y., Rosas-Pérez I., García-Cuellar CM (2008). PM10 induced antioxidant pretein activity inhibition correlates to oxidative damage. en proceso.
61. Schwartz DA (2001). Does inhalation of endotoxi cause asthma?. *Am J Respir Crit Care Med.* 163: 39-46
62. Smith BP., Lampi BJ., Sarwar G., Botting HG (1995). A comparison of methods for determining total body protein. *Anal Biochem.* (20) 226-1: 26-30.
63. Singh I., Kremser K., Ghosh B, Singh AK., Pai S (1996). Abnormality in translational regulation of catalase expression in disorders of peroxisomal biogenesis. *J Neurochem.* 67:2373-2378.
64. Singh R., Kaur B., Kalina I., Popov TA., Georgieva T., Garte S., Binkova B., Sram RJ., Taioli E., Farmer PB (2007). Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutat Res.* (620) 1-2:71-82.
65. Stadtman ER (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.* 9:315-325.
66. Stadtman ER., Berlett BS (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem.* 266:17201-17211.
67. Stohs SJ., Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biol Med.* 18:321-336.

68. Taioli M., Sram JR., Garte S., Kalina I., Popov AT., Farmer BP (2007). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage (EXPAH project): description of the population under study. *Mutation Research*. 620:1-6
69. Therond P (2003). Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharma Fr* (64) 6: 383-389.
70. Topinka J., Sevastyanova O., Binkova B., Chvatalova I., Milcova A., Lnenickova Z., Novakova Z., Solansky I., Sram RJ (2007). Biomarkers of air pollution exposure-A study of policemen in Prague. *Mutat Res*.
71. Valavanidis A., Vlahoyianni T., Fiotakis K (2005). Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic Res*. 10:1071-81.
72. Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biological Int*. 160:1-40.
73. Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermosillo AG., Márquez MF., Cardenas M (2003). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México, *Gaceta Medica de México*. 139 1:57-63.
74. Vineis P., Hoek G., Krzyzanowski M., Vigna-Taglianti F., Veglia F., Airoidi L., Autrup H., Dunning A., Garte S., Hainaut P., Malaveille C., Matullo G., Overvad K., Raaschou-Nielsen O., Clavel-Chapelon F., Linseisen J., Boeing H., Trichopoulou A., Palli D., Peluso M., Krogh V., Tumino R., Panico S., Bueno-De-Mesquita HB., Peeters PH., Lund EE., Gonzalez

- CA., Martinez C., Dorronsoro M., Barricarte A., Cirera L., Quiros JR., Berglund G., Forsberg B., Day NE, Key TJ., Saracci R., Kaaks R., Riboli E (2006). Air pollution and risk of lung cancer in a prospective study in Europe. *Int J Cancer*. (119) 1:169-74.
75. Vinzents PS., Moller P., Sorensen M., Knudsen LE., Hertel O., Jensen FP., Schibye B., Loft S (2005). Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Environ Health Perspect*. (113) 11:1485-90.
76. Von Klot S., Wolke G., Tuch T., Heinrich J., Dockery DW., Schwartz J., Kreyling WG., Wichmann HE., and Peters A (2002). Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur. Respir. J*. 20:691-702.
77. Waris G., Haseeb A (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*. 5-14.
78. Zhu X., Su B., Wang X., Smith MA., Perry G (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci*.
79. Zidzik J., Khalina I., Salagoviz J., Sram JR., Rössner., Popov T., Farmer BP (2007). Influence of PAHs in ambient air on chromosomal aberrations in exposed subjects: international study – EXPH. *Mutation Research*. 620: 41-48.