



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ESTUDIOS DE  
POSGRADO



**Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con  
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. “Efecto de  
contaminantes de la Atmósfera Material Particulado 2.5”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA.**

P R E S E N T A :

***M en C. YESSICA DORIN TORRES RAMOS***

Directores de Tesis: Juan José Hicks G.

Ivonne María Olivares Corichi



MÉXICO, D. F.

2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

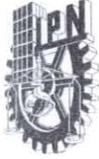
*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 8 del mes octubre del año 2010, la que suscribe Torres Ramos Yessica Dorin del Programa de Doctorado en Ciencias en Investigación en Medicina con número de registro B061714, adscrita a Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Ivonne María Olivares Corichi y el Dr. Juan José Hicks Gómez y cede los derechos del trabajo intitulado “Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Efecto de contaminantes de la Atmósfera Material Particulado 2.5”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [toye\\_dorin@yahoo.com.mx](mailto:toye_dorin@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Yessica Dorin Torres Ramos', is positioned above a horizontal line.

M. en C. Yessica Dorin Torres Ramos  
Nombre y firma



SIP-14-BIS

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de febrero del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESM para examinar la tesis titulada:

Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. "Efecto de contaminantes de la Atmósfera Material Particulado 2.5"

Presentada por el alumno:

<u>Torres</u> <small>Apellido paterno</small>	<u>Ramos</u> <small>Apellido materno</small>	<u>Yessica Dorin</u> <small>Nombre(s)</small>							
Con registro:									
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">6</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">7</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">4</td> </tr> </table>			B	0	6	1	7	1	4
B	0	6	1	7	1	4			

aspirante de:

### DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

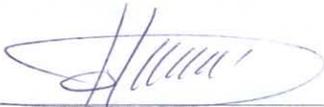
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ivonne Maria Olivares Corichi

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan José Hicks Gómez

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Asbun Bojalil

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I. P. M.  
SECCION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION

**Esta tesis se realizó en:**

En el laboratorio de Bioquímica Inorgánica, del Departamento de Bioquímica y Medicina Ambiental. Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias."ISMAEL COSIO VILLEGAS". México. D.F

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

1.- Beca Doctorado: Registro 165040

**Con el apoyo de la Beca Institucional del Instituto Politécnico Nacional de  
la Escuela Superior de Medicina**

1.- Beca Institucional Doctorado: 412591

ÍNDICE		Pág
I.	Glosario	4
II.	Relación de figuras	5
III.	Relación de tablas	6
IV.	Relación de gráficas	7
V.	Resumen	10
VI.	Abstract	11
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
1.1	GENERACIÓN DE ERO	14
1.2	MECANISMOS ANTIOXIDANTES	17
1.2.1.	<i>Superóxido Dismutasa</i>	18
1.2.2	<i>Catalasa</i>	19
1.2.3	<i>Glutación Peroxidasa</i>	20
1.2.4	<i>Glutación Reducido (GSH)</i>	21
1.2.5	<i>Paraoxonasa (esterasa A)</i>	22
1.3	ESTRÉS OXIDANTE	23
1.3.1	<i>Adaptación al estrés oxidante</i>	24
1.3.2	<i>Estrés oxidante agudo</i>	24
1.3.3	<i>Estrés oxidante crónico</i>	24
1.4	DAÑO A BIOMOLÉCULAS	24
1.4.1	<i>Oxidación de lípidos</i>	27
1.4.2	<i>Oxidación de proteínas</i>	27
1.4.3	<i>Oxidación de ácidos nucleicos</i>	28
1.5	ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA	29
1.5.1	<i>Epidemiología de la EPOC en México.</i>	30
1.5.2	<i>Definición de la EPOC</i>	30
1.5.3	<i>Clasificación de la EPOC</i>	30
1.5.4	<i>Patogénesis de la EPOC</i>	30
1.5.5	<i>Hipoxia Tisular</i>	31
1.5.6	<i>Mecanismos de compensación de la EPOC a la hipoxia</i>	32
1.5.7	<i>Factores de riesgo para padecer EPOC</i>	33
1.5.7.1	<u>Tabaquismo</u>	33
1.5.7.2	<u>Humo de leña</u>	33
1.5.7.3	<u>Exposición laboral</u>	33
1.5.7.4	<u>Contaminación ambiental</u>	33
1.6	CONTAMINACIÓN ATMOSFERICA	33
1.6.1	<i>Contaminantes de la atmosfera</i>	34
1.6.1.1	<u>Material Particulado</u>	35
1.6.2	<i>Efectos en la Salud por Contaminantes Atmosféricos</i>	36
1.6.3	<i>Efectos en la salud por material particulado</i>	38
1.6.4	<i>Interacción de las PM con el árbol bronquial y su relación con el transporte de oxígeno</i>	44
1.7	ERITROCITO	47
1.7.1	<i>Vías metabólicas utilizadas por el eritrocito.</i>	47
1.7.1.1	<u>Glucólisis</u>	47

1.7.1.2 Ciclo de las pentosas	48
1.7.1.3 Vía de la hemoglobina reductasa	48
1.7.1.4 Ciclo de Rapoport-Luebering	49
1.7.2 Estructura de la membrana del eritrocito	50
1.7.3 Proteínas Banda 3	52
1.7.4 Actividad de Fosfotirosina Fosfatasa	55
1.7.5 Alteraciones biológicas en los eritrocitos debido al EO	57
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	60
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	61
<b>4. HIPOTESIS</b>	62
<b>5. OBJETIVOS</b>	63
5.1 OBJETIVO GENERAL	63
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	63
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	64
6.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS	64
6.2 TIPO DE ESTUDIO	65
6.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA	65
6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	65
6.4.1 Criterios de inclusión para pacientes con EPOC	65
6.4.2 Criterios de eliminación para pacientes con EPOC.	65
6.4.3 Criterios de inclusión para el grupo control	65
6.4.4 Criterios de eliminación para el grupo control	65
6.4.5 Pruebas clínicas	66
6.4.5.1 Exámenes de Laboratorio	66
6.4.5.2 Pruebas de función respiratoria	66
6.5 TOMA DE MUESTRA	67
6.6 SEPARACIÓN PAQUETE DE ERITROCITOS	67
6.7 LAVADO DE ERITROCITOS	67
6.8 ESTANDARIZACIÓN EN LAS CONCENTRACIONES DE LOS INDUCTORES DE DAÑO OXIDATIVO	67
6.8.1 Conteo de los eritrocitos	68
6.8.2 Determinación de la hemólisis en los eritrocitos	69
6.9 TRATAMIENTO DE LOS ERITROCITOS ANTE LOS INDUCTORES DE DAÑO OXIDATIVO	73
6.10 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE ERITROCITO	74
6.11 BIOMARCADORES DE DAÑO A LIPIDOS	74
6.11.1 Determinación de Dienos conjugados	74
6.11.2 Determinación de Hidroperóxidos	75
6.11.3 Determinación del Malondialdehído	75
6.12 BIOMARCADOR DE DAÑO A PROTEÍNAS	76
6.12.1 Carbonilación de proteínas	76
6.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFOTIROSINA FOSFATASA.	77
6.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA	77
6.15 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARAOXONASA	78
6.16 VALORACIÓN ESTADÍSTICA	78
<b>7. RESULTADOS</b>	79
7.1 DATOS DEMOGRÁFICAS	79

7.2 BIOMETRIA HEMÁTICA	80
7.3 PERFIL DE LÍPIDOS	81
7.4. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	82
7.4.1 <i>Primera etapa</i>	82
7.4.1.1 <u>Biomarcadores de Estrés oxidativo determinados en plasma</u>	82
7.4.1.2 <u>Biomarcadores de EO determinados en membranas de eritrocito</u>	90
7.4.2 <i>Segunda etapa</i>	96
7.4.2.1 <u>Características de las PM</u>	96
7.4.2.2 <u>Biomarcadores de EO en eritrocitos expuestos a PM</u>	99
<b>8. DISCUSIÓN</b>	107
<b>9. CONCLUSIONES</b>	113
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	114
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	115
<b>ANEXOS</b>	

---

## I. Glosario

$\text{NO}^\bullet$	Óxido nítrico
$\text{HO}^\bullet$	Radical Hidroxilo
$^1\text{O}_2^*$	Singulete de oxígeno
CAT	Catalasa
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GOLD	Iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GSH	Glutati3n reducido
GSH-Px	Glutati3n Peroxidasa
$\text{H}_2\text{O}_2$	Per3xido de Hidr3geno
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ani3n super3xido
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
MDA	Malondialdehido
PON-1	Paraoxonasa.
RL	Radicales Libres
SOD	Super3xido Dismutasa
TCA	3cido tricloroac3tico
LPx	Lipoperoxidaci3n
PCR	Prote3na C reactiva
$\text{FEV}_1$	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
PM	Material Particulado
PTPasa	Fosfotirosina Fosfatasa
AE-1	Intercambiador Ani3nico
LPH	Lipohidroperoxidos
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
S5P8	Soluci3n 5mM pH 8.0

## II. Relación de Figuras

---

Figura 1. Molécula de HDL

Figura 2. Fase de Iniciación en el proceso de lipoperoxidación

Figura 3. Fase de Propagación en el proceso de lipoperoxidación

Figura 4. Fase de Terminación en el proceso de lipoperoxidación.

Figura 5. Microscopia electrónica de reflexión de superficie del Material  
Particulado (PM)

Figura 6. Vías metabólicas del eritrocito involucradas para mantener su  
capacidad antioxidante.

Figura 7. Vía de síntesis y degradación de 2,3-bisfosfoglicerato en eritrocitos

Figura 8. Estructura de la membrana del eritrocito

Figura 9. Intercambio aniónico por la banda 3

Figura 10. Extrusión del CO<sub>2</sub>

Figura 11. Fotomicrografía de partículas contaminantes

Figura 12. Fotomicrografía de partículas contaminantes

---

### III. Relación de Tablas

---

Tabla 1. Clasificación clínica funcional de la EPOC

Tabla 2. Alteraciones biológicas en los eritrocitos de pacientes con EPOC debido al estrés oxidativo

Tabla 3 Características Demográficas y de Función Pulmonar

Tabla 4. Biometría hemática

Tabla 5. Perfil de Lípidos

Tabla 6. Caracterización de las PM<sub>10</sub> (fracción fina <2.5)

---

#### IV. Relación de Gráficas

---

Gráfica 1. Conteo de los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ .

Gráfica 2. Espectro de absorción de 300-700 nm, para la determinación de la hemólisis en los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$

Gráfica 3. Determinación de la hemólisis en los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$

Gráfica 4. Ensayos para determinar si influye la composición química de las partículas para llevar a cabo la reacción de Fenton

Gráfica 5. Determinación de Lipohidroperóxidos en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

Gráfica 6. Determinación de Malondialdehído en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

Gráfica 7. Determinación de Malondialdehído en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

Gráfica 8A. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por mg de proteína, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 8B. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por mg de HDL, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 8C. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por nmol p-nitrofenol/mg Apo-A/min, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV),

Gráfica 9A. Correlación negativa entre Paraoxonasa (expresada por HDL) y su sustrato lipohidroperóxidos

Gráfica 9B. Correlación negativa entre Paraoxonasa (expresada por Apo-A) y su sustrato lipohidroperóxidos

Gráfica 10. Correlación negativa entre Paraoxonasa y la carbonilación de

---

---

proteínas

Gráfica 11. Determinación de Dienos conjugados en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

Gráfica 12. Determinación de Lipohidroperóxidos en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 13. Determinación de Malondialdehído en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 14. Determinación de la carbonilación de proteínas en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 15. Determinación de la actividad enzimática de Fosfotirosina Fosfatasa en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

Gráfica 16. Determinación de Dienos conjugados en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

Gráfica 17. Determinación de Lipohidroperóxidos en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

Gráfica 18. Determinación de Malondialdehído en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

Gráfica 19. Determinación de la carbonilación de proteínas en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

Gráfica 20. Determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control

Gráfica 21. Determinación de las concentraciones de sulfidrilos no proteicos en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en

---

pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

Gráfica 22. Correlación negativa entre la carbonilación de proteínas y la actividad enzimática de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

Gráfica 23. Correlación positiva entre la concentración de SH no proteicos y de la actividad enzimática de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

Gráfica 24. Actividad enzimática de la Fosfotirosina Fosfatasa en membranas de eritrocitos de pacientes con EPOC (moderado y severo), antes y después de ser expuestos a las  $PM_{2.5}$ .

---

#### **IV. Resumen.**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es diagnosticada mediante pruebas de función respiratoria (espirometrías), en diferentes estadios (0, I, II, III, ó IV). La EPOC, cursa con un desequilibrio, metabólico denominado estrés oxidativo, lo que origina modificaciones estructurales y funcionales en prácticamente todos los tejidos y células incluyendo a los eritrocitos, en donde se presenta una disminución en la capacidad para transportar y difundir el oxígeno hacia los tejidos, debido a que la capacidad de oxigenación de la hemoglobina se ve afectada por su cambio de potencial redox oxidándose al estado férrico (metahemoglobina), lo que conduce a la hipoxia tisular. El estado redox de la hemoglobina depende de la eficiencia del sistema antioxidante, intrínseco del eritrocito, que requiere de la utilización de vías eficientes para generar ATP (sin la cadena respiratoria), así como de un poder reductor adecuado representado por la presencia de NADPH y glutatión reducido, para mantener la integridad de su membrana.

Los pacientes con EPOC son considerados población susceptible a la contaminación atmosférica la que se encuentra constituida por gases y material particulado (PM), este último es causante de un daño mayor en enfermos pulmonares, quienes son afectados cuando el material particulado, logra establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolo capilar por translocación, pudiendo en consecuencia causar efectos a nivel sistémico. En este estudio se evaluó la eficiencia en la adaptación de los eritrocitos de pacientes con EPOC (GOLD I, II, III y IV), cuando estos son sometidos a un reto in vitro con PM, para tal efecto fueron evaluados parámetros de daño oxidativo en membranas de eritrocitos de pacientes con EPOC, así como la determinación de enzimas relacionadas con el proceso y con la generación de metabolitos reductores.

Con los resultados obtenidos concluimos que es posible que los eritrocitos de pacientes con EPOC, se encuentren lesionados por la progresión de la enfermedad, además de que mostraron una mayor probabilidad de aumentar el daño con la presencia de partículas contaminantes, en comparación con los eritrocitos de voluntarios sanos.

## **V. Abstract**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is diagnosed by pulmonary function tests (spirometry) at different stages (0, I, II, III, or IV). COPD, causes an imbalance, metabolic called oxidative stress, which causes structural and functional changes in virtually all tissues and cells including erythrocytes, where it has a decreased ability to transport and diffuse oxygen to the tissues because the oxygenation capacity of hemoglobin is affected by the change of redox potential oxidizes to the ferric state (methemoglobin), which leads to tissue hypoxia. The redox state of hemoglobin depends on the efficiency of antioxidant system, intrinsic to the erythrocyte, which requires the use of efficient ways to generate ATP (without the respiratory chain) and a suitable reducing power represented by the presence of NADPH and reduced glutathione to maintain the integrity of the membrane.

Patients with COPD are considered susceptible population to air pollution which is made up of gases and particulate matter (PM), the latter causing further damage to pulmonary patients who are affected when the material particles of a diameter less than 2.5 microns, can establish contact with the alveolar surface and alveolar capillary barrier through the translocation and may therefore cause systemic effects. This study evaluated the efficiency in the adaptation of erythrocytes from patients with COPD (GOLD I, II, III and IV), when they are subjected to in vitro challenge with PM to this effect were evaluated parameters of oxidative damage in erythrocyte membranes of patients with COPD, and the determination of enzymes involved in the process and reducing the generation of metabolites.

With these results we conclude that it is possible that erythrocytes of patients with COPD, are injured by the progression of the disease, and that were more likely to increase the damage with the presence of particulate pollutants, compared to erythrocytes healthy volunteers. This is one of the first projects to demonstrate the differences in the responses of healthy populations and susceptible to pollution.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los diferentes contaminantes del aire que se encuentran en las grandes ciudades, han sido relacionados mediante numerosas investigaciones, con un riesgo mayor de enfermar y morir por enfermedades respiratorias y cardiovasculares <sup>(Andersen et al., 2011)</sup>.

Es frecuente encontrar informes de las diferentes instituciones públicas y privadas encargadas de vigilar la calidad del aire en las grandes ciudades, en los cuales se da cuenta del incremento de las concentraciones de contaminantes ambientales, excediendo las normas de calidad del aire.

La evidencia de numerosos estudios en diferentes partes del mundo relaciona elevadas concentraciones de contaminantes del aire con efectos agudos y crónicos en la salud <sup>(Johnson, 2011)</sup>. Un aumento en la mortalidad por causas cardiovasculares, respiratorias, cáncer de pulmón e infecciones respiratorias agudas en los niños ha sido asociada con la presencia de niveles de contaminantes que exceden las normas de calidad del aire exterior <sup>(Betts, 2011)</sup>.

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) de acuerdo al censo del 2000 es una de las ciudades más pobladas del mundo con 18 millones de habitantes <sup>(Secretaría del medio Ambiente 2000-2006)</sup>. La ZMVM se encuentra aproximadamente a una altitud de 2240 metros de elevación sobre el nivel del mar, está rodeada de montañas hacia el sur, oeste y este. A esta altitud hay 23% menos de oxígeno disponible, lo que origina que los procesos de combustión sean menos eficientes <sup>(Molina et al, 2002)</sup>.

Se ha demostrado que se presenta la formación de nuevas partículas ante el incremento de las concentraciones de dióxido de sulfuro y otros compuestos. Lo cual es importante debido a que la vida media atmosférica del azufre emitido en la Ciudad de México es de 5.5 días el cual es más largo que la vida media liberado en el resto del mundo (3-9 días) <sup>(Laniado-Laborin et al., 2011)</sup>. Debido a la altitud y la latitud subtropical de la Ciudad de México, la región recibe una intensa radiación solar que favorece la formación fotoquímica de contaminantes. Las partículas contaminantes durante el transporte aéreo presentan cambios en la composición química dando lugar a material particulado (PM con sus siglas en inglés) con propiedades químicas diferentes. Estos cambios son debidos a la formación de nuevos compuestos.

Se ha demostrado que las partículas contaminantes debido a su muy diversa composición pueden generar la formación de Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno.

La formación de Especies Reactivas de Oxígeno es un proceso normal e inevitable, ya que son producto de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular <sup>(Knuckles et al., 2011)</sup>. Estas especies reactivas no causan daño oxidativo en condiciones no fisiopatológicas debido a que la célula está provista de mecanismos antioxidantes (enzimáticos por ejemplo: glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT), paraoxonasa y no enzimáticos como él: ácido úrico, vitamina C, E, entre otros) <sup>(Abe et al., 2011)</sup>. Cuando los sistemas productores de ERO sobrepasan la capacidad neutralizante de los sistemas antioxidantes del organismo, debido a una disminución de la capacidad antioxidante (enzimática y no enzimática) o a un incremento en la producción de radicales (patologías diversas, exposición a radiaciones ionizantes, radiación UV, entre otros) se establece el estado de desequilibrio denominado Estrés Oxidativo (EO), estado metabólico que se vincula con diversas enfermedades como aterosclerosis, artritis reumatoide, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), entre otras <sup>(Fischer et al., 2011)</sup>. La EPOC es un estado de enfermedad caracterizado por la limitación de flujo respiratorio que no es completamente reversible. La limitación de flujo respiratorio es normalmente progresiva y se asocia con la respuesta anormal e inflamatoria de los pulmones a las partículas y gases nocivos. La EPOC es una causa importante de morbimortalidad entre las enfermedades crónicas de todo el mundo y su prevalencia y mortalidad se incrementarán en las próximas décadas. Se estima que 60 millones la padecen y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la prevalencia estimada para hombres es de 11.6/1000 y de 8.77/1000 en las mujeres. En la zona metropolitana de la ciudad de México el 7.8% de la población de más de 40 años la padece y se ubica en el 5to lugar de mortalidad <sup>(Laniado-Laborin et al 2011)</sup>.

Los factores de riesgo más frecuentes causantes de la enfermedad son, el tabaquismo y la exposición a partículas contaminantes (PM con sus siglas en ingles) y al carbón <sup>(Repine et al, 1997)</sup>. Las PM tienen una mayor posibilidad de establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolo capilar por translocación, y en consecuencia pueden causar efectos a nivel sistémico. Dado su contenido rico en compuestos químicos oxirreductores y su habilidad para dañar a las células, estas partículas producen una gran respuesta inflamatoria en tejidos pulmonares y extra-pulmonares, como el endotelio vascular, incluyendo el de los vasos coronarios. El daño oxidativo a nivel pulmonar causado por el EO relacionado con la progresión de la EPOC, afecta entre otros sistemas en primera instancia a los eritrocitos, dificultando el transporte y la difusión del oxígeno, así como una disminución en la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> <sup>(Jafari et al., 2010)</sup>. El estado redox de la hemoglobina depende de la eficiencia del sistema antioxidante, intrínseco del eritrocito, que requiere de la

utilización de vías eficientes para generar ATP, así como de un poder reductor adecuado representado por la presencia de NADPH y glutatión reducido, para mantener la integridad de su membrana <sup>(Corsonello et al, 2011)</sup>.

En los últimos años se han incrementando los estudios que destacan la importancia de la contaminación ambiental y su impacto en salud, sobre todo en poblaciones susceptibles, este proyecto nos ayudara a entender los mecanismos bioquímicos que permitan explicar la susceptibilidad y la ausencia en el rompimiento membranal (hemolisis) del eritrocito asegurando el aporte aunque disminuido de oxígeno, lo que facilita la sobrevivencia del organismo aun en condiciones de agresión extrema (PM), en donde se ven involucrados las especies reactivas de oxígeno (ERO), que incluyen a los radicales libres (RL) del oxígeno y/o nitrógeno y a las especies moleculares precursoras de las mismos.

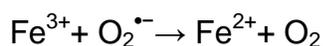
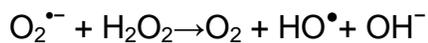
### 1.1 GENERACIÓN DE ERO

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con las moléculas que se encuentran a su alrededor. Las ERO incluyen: anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); además, habría que considerar, a las especies reactivas de nitrógeno (ERN); estas especies incluyen al óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) al peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) entre las más importantes, y que participan en diferentes procesos biológicos, como en el funcionamiento de los tejidos vasculares. Entre las moléculas que se consideran ERO se encuentran los radicales libres, los cuales pueden ser definidos como átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos <sup>(Halliwell y Gutteridge, 1999)</sup>. Este electrón es generalmente el que le proporciona su alta capacidad reactiva. Los radicales libres derivados del oxígeno son considerados los radicales más importantes producidos por los seres vivos <sup>(Miller et al., 1990)</sup>. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es considerado por sí mismo un radical libre. La adición de un electrón al dioxígeno forma el anión superóxido <sup>(Miller et al., 1990)</sup>. Este radical puede ser producido por diferentes mecanismos en los que se presenta la activación del oxígeno, ya sea por procesos bioquímicos o por irradiaciones electromagnéticas; el anión superóxido reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras ERO secundarias en donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición entre los que destacan el hierro y el cobre, originando una reacción tipo Fenton <sup>(Valko et al., 2005)</sup>. La formación del anión superóxido se

origina principalmente en la mitocondria (Cadenas y Sies, 1998). La cadena de transporte de electrones es la principal fuente de ATP en las células de mamíferos y es, por tanto, esencial para la vida. Durante la transducción de energía, una pequeña cantidad de electrones provenientes de la cadena de transporte de electrones se unen al oxígeno molecular para formar el radical libre anión superóxido, el cual ha sido implicado en la fisiopatología de diferentes enfermedades (Kovacic et al., 2005; Valko et al., 2004). Se ha evaluado la cantidad de partículas submitocondriales que se producen en la cadena de transporte de electrones sugiriendo que entre 1 y 3% de los electrones provenientes de ésta pueden generar el anión superóxido. Los complejos I y III de la cadena de transportes de electrones son los principales generadores de este radical libre. Recientemente se ha demostrado que el anión superóxido proveniente del complejo I es liberado dentro de la matriz mitocondrial ya que no se han detectado niveles de éste en mitocondrias intactas y, por tanto, los producidos en el complejo III son vertidos al citosol (Mulleret et al., 2004).

Otra importante ERO que se produce en el metabolismo celular es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que puede ser generado directamente por algunas enzimas óxido-reductasas, como es el caso de la glucosa oxidasa (Massey et al., 1969) y la isoforma de la NADPH oxidasa. Sin embargo, la mayoría del  $H_2O_2$  es producto de la dismutación del radical superóxido que es producido en la mayoría de las reacciones catalizadas por las NADPH oxidasas (Lambeth, 2002), por la fuga de electrones provenientes de la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Loschen et al., 1974; Forman y Kennedy, 1974), la biotransformación de xenobióticos (McCord y Fridovich, 1970) y otras flavoproteínas (Massey et al., 1969). Otro sitio de producción del  $H_2O_2$  son los peroxisomas, donde se presentan diferentes reacciones de biotransformación en las que el oxígeno es reducido a  $H_2O_2$  por los electrones provenientes de las moléculas a detoxificar; posteriormente el  $H_2O_2$  es convertido en agua en los propios peroxisomas (De Duve y Baudhuin, 1969). Sin embargo, el proceso bioquímico que produce más  $H_2O_2$  es la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos que se lleva a cabo en los peroxisomas; debido a las reacciones enzimáticas de las flavin oxidasas, se ha estimado que 35% de todo el  $H_2O_2$  formado en el hígado de ratas es producido por estas reacciones (Boveris et al., 1972). El  $H_2O_2$  es una ERO muy importante ya que al igual que el anión superóxido puede dar origen a otras ERO secundarias. Cuando hablamos de ERO, generalmente hablamos de moléculas que potencialmente podrían causar daños a las biomoléculas. En los últimos años se ha venido postulando a los radicales libres como moléculas transductoras de señales; el caso particular del  $H_2O_2$  es uno de los más importantes, ya que se le ha considerado un segundo mensajero porque diferentes tipos de enzimas pueden modular sus concentraciones, como el caso de las óxido

reductasas y en especial la NADPH oxidasa que incrementan sus niveles celulares o la actividad de enzimas como la catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas que se encargan de disminuir sus concentraciones celulares; se ha observado que la respuesta celular a las variaciones del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está en el rango de nmoles <sup>(Antunes y Cadenas, 2000)</sup>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula altamente utilizada en investigación porque es un potencial segundo mensajero y por sus propiedades fisicoquímicas le permiten ingresar fácilmente al interior de la célula. Entre las ERO más importantes que se producen durante el metabolismo de los organismos aeróbicos se encuentra el radical hidroxilo (HO•) que puede ser considerado como la forma sin carga neta del ión hidroxilo. El radical hidroxilo tiene una alta reactividad que lo hace sumamente peligroso y, además, presenta un tiempo de vida muy corto de aproximadamente 10<sup>-9</sup> segundos. <sup>(Pastor et al., 2000)</sup>. Estas propiedades químicas del radical hidroxilo le permiten reaccionar rápidamente con cualquiera de las moléculas que se encuentran a su alrededor. El radical hidroxilo puede ser producido in vivo por reacciones en las que participan metales de transición como el hierro y el cobre, que participan en diferentes procesos biológicos como la cadena de transporte de electrones. Una de las reacciones más conocidas en donde se produce el radical hidroxilo es la reacción de Fenton; el peróxido de hidrógeno reacciona con el hierro de manera homolítica, formando un anión hidróxido y un radical hidroxilo (Fe<sup>2+</sup>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>→ Fe<sup>3+</sup>+ HO•+OH<sup>-</sup>) <sup>(Valko et al., 2005; Leonard et al., 2004)</sup>. Sin embargo, no es la única manera que se produce in vivo el radical hidroxilo, ya que el anión superóxido puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y en presencia de hierro como catalizador formar oxígeno, un anión hidróxido y un radical hidroxilo en una reacción conocida como Haber-Weiss <sup>(Liochev y Fridovich, 2002)</sup>, la cual puede ser descrita en dos reacciones:



Entre las ERN, se encuentra el óxido nítrico (NO•), el cual es una pequeña molécula que tiene un electrón desapareado sobre el enlace 2π y el orbital Py y es considerado un radical libre. El radical óxido nítrico es producido en diferentes tejidos por medio de la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual durante su actividad enzimática cataliza la reacción de Arginina a Citrulina y produce el radical óxido nítrico en una reacción oxidativa en la que participan cinco electrones <sup>(Ghafourifar y Cadenas, 2005)</sup>. El óxido nítrico es muy abundante y es considerada una molécula que participa en muchos procesos de señalización, tales como la neurotransmisión, la regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y la regulación del sistema inmune <sup>(Bergendi et al., 1999)</sup>. El óxido nítrico tiene un tiempo de vida media de unos cuantos segundos en medio acuoso, así como una alta

estabilidad en un sistema libre de oxígeno. Sin embargo, tiene una alta capacidad de difusión en las membranas y en el citoplasma (Chiueh, 1999), por lo que participa en fenómenos como la transmisión neuronal y la plasticidad sináptica, en el sistema nervioso central. En el medio intracelular, el NO• reacciona con el oxígeno y el agua para formar nitratos y nitritos.

## 1.2 MECANISMOS ANTIOXIDANTES

La exposición a las ERO/ERN producidas por una diversa cantidad de procesos fisiológicos o ambientales ha llevado a los organismos a desarrollar numerosos mecanismos de defensas (Cadenas, 1997). Los organismos se protegen contra el estrés oxidativo inducido por las ERO con mecanismos que pueden ser preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes. Estos últimos son de los más importantes y están compuestos por enzimas antioxidantes entre las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la Catalasa (CAT) y otros no enzimáticos entre los que se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH), carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes. (Chargui et al., 2010) En condiciones normales, siempre existe un equilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes para que los organismos se encuentren en las condiciones necesarias para la supervivencia y la salud del individuo

### 1.2.1 Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) está presente en todos los tipos celulares y se ha demostrado que tiene un papel muy importante en la protección de las células y tejidos contra el estrés oxidativo. Se han descrito tres isoformas de ella, pero todas tienen un mecanismo en común: la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno como se puede observar en la siguiente ecuación:

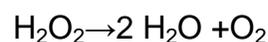


La ecuación es de primer orden y tiene una constante de Michaelis Menten  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; su actividad está regulada por los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y, por lo tanto, presenta mecanismos de retroalimentación con las enzimas encargadas de transformar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua como la catalasa y la glutatión peroxidasa. La SOD dependiente de cobre y zinc (SOD Cu/Zn) se encuentra en el citosol; es una proteína homodimérica con un peso molecular de 32.5 kDa y requiere tener cobre y zinc en su sitio activo (Fridovich y Freeman, 1986). El cobre es esencial para la reacción catalítica, mientras que el zinc es importante para mantener la estructura de la

proteína (Fridovich, 1975). La SOD Cu/Zn no es esencial para el desarrollo y la supervivencia, por lo que los ratones que carecen de esta enzima se desarrollan normalmente hasta adultos sin presentar aparentes daños oxidativos (Tsan, 2001); la sobreexpresión de la SOD Cu/Zn no altera la expresión de la SOD-Mn (White et al., 1993) y tampoco modifica su expresión cuando hay deficiencias de la SOD-Mn (Copin et al., 2000). La SOD manganeso (SOD-Mn) es considerada una de las enzimas antioxidantes más importantes de la célula. Es una enzima homotetramérica con un peso molecular de 88 kDa y requiere manganeso en su centro activo (Fridovich, 1975). Constituye de 10 a 15% de las SOD y se localiza en la mitocondria (Tsan, 2001). La supervivencia de los ratones ha sido relacionada a la SOD Mn, ya que ratones deficientes en este gen mueren entre los 10 y 21 días de nacidos de cardiomiopatías, acidosis metabólica y neurodegeneración (Lebowitz et al., 1996; Li et al., 1995). La SOD extracelular (SOD EC) es muy abundante en los fluidos pulmonares y en los espacios intersticiales de los pulmones de ratones y humanos. La SOD EC también es muy abundante en los vasos sanguíneos y en las vías respiratorias aéreas. Es una glicoproteína de secreción en forma de tetrámero con un peso molecular de 135 kDa y requiere cobre y zinc para su actividad como la isoforma citosólica (Marklund, 1984). Característicamente, la SOD EC presenta afinidad heterogénea con la heparina (Marklund, 1982), regula la actividad y modula los niveles del óxido nítrico (Oury et al., 1996). La expresión de SOD EC es inducida por interferón gamma y es inhibida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y la interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) en cultivo de fibroblastos (Marklund, 1992).

### 1.2.2 Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante que tiene una estructura homotetramérica con un peso molecular de 240 kDa (Fridovich y Freeman, 1986) y su función principal es convertir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno molecular como se muestra en la siguiente reacción:



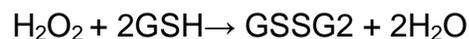
La CAT está presente en la mayoría de las células aeróbicas de animales y se encuentra en mayores proporciones en el hígado y los eritrocitos. El cerebro, el corazón y el músculo esquelético presentan bajas concentraciones de ésta. La CAT se localiza en los peroxisomas y en el citoplasma en neumocitos y macrófagos (Kinnula et al., 1995). Es considerada una de las enzimas antioxidantes más importantes en la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno en los neumocitos de rata (Simon et al., 1989).

Sin embargo, se ha observado en estudios con modelos animales o en cultivos celulares que la CAT puede ser inducida por hipoxia, oxidantes o citocinas (White et al., 1989a; Tsan et al., 1990; Shull et

al., 1991), aunque se han reportado resultados controversiales (Jornot y Junod, 1992; Pietarinen-Runtti et al., 1998). La exposición de lipopolisacáridos en ratas disminuye la expresión de la CAT (Clerch et al., 1996). La única enzima antioxidante que se encuentra incrementada tanto en los niveles de expresión del mRNA como en su actividad durante morfogénesis de los pulmones humanos es la CAT (Asikainen et al., 1998). Resulta interesante que la sobreexpresión de la CAT en la mitocondria presenta un incremento en la vida en un modelo murino (Schriner et al., 2005).

### 1.2.3 Glutación Peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es una familia de enzimas antioxidantes dependientes de selenio y puede ser dividida en dos grupos: las celulares y las extracelulares. En general, la GPx es una proteína tetramérica con un peso molecular de 85 kDa; requiere tener dentro de su estructura funcional cuatro átomos de selenio unidos a cisteínas y con esta modificación adquiere actividad catalítica. La función principal de esta enzima es reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua, oxidando a una molécula de glutación (GSH) (Kinnula et al., 1995), como se presenta en la siguiente ecuación:



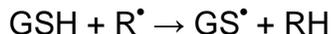
La reducción del glutación oxidado (GSSG) es catalizado por la glutación reductasa, como se muestra en la siguiente ecuación:



Trabajando acopladas, estas dos enzimas generan el ciclo del reciclamiento de GSH (Halliwell y Gutteridge, 1989). Debido a su capacidad para reciclar el GSH, estas reacciones acopladas son esenciales para la defensa celular antioxidante y previenen la pérdida de los tioles celulares (Heffner y Repine, 1989). Existen tres enzimas GPx dependientes de selenio diferentes genéticamente y sólo una no dependiente de selenio; la forma clásica dependiente de selenio ha sido identificada en una gran variedad de células (Mullenbach et al., 1988). Estas enzimas están presentes en el citosol de la mayoría de las células. Se ha reportado una forma extracelular de GPx dependiente de selenio en los revestimientos de los epitelios pulmonares y otras células del pulmón (Avissar et al., 1996). También se ha reportado actividad de GPx en la mitocondria (Mbemba et al., 1985; Esworthy et al., 1997).

### 1.2.4 Glutación reducido (GSH)

El antioxidante con grupo funcional tiol más importante es el tripéptido glutatión reducido (GSH). Se trata de un antioxidante no enzimático intracelular multifuncional, considerado el mejor buffer redox de la célula. El GSH es muy abundante en el citosol 1-11mM, en el núcleo 3-15mM y en la mitocondria 5-11mM; se le considera el antioxidante soluble más abundante en estos compartimentos (Masella et al., 2005). Se encuentra presente en los sistemas biológicos en dos formas: la reducida GSH y la oxidada GSSG o glutatión disulfuro. Entre las funciones que se han descrito del GSH se encuentra la de mantener el estado redox en el núcleo de proteínas con altos niveles de residuos de aminoácidos con sulfhidrilos que son necesarias para la expresión y reparación del ADN. Un ambiente oxidado modifica rápidamente los sulfhidrilos de las proteínas (proteína-SH) oxidando dos electrones y formando grupos funcionales de ácido sulfónico (proteína-SOH) u oxidando un electrón formando radicales tiolil (proteína-S•) (Ji et al., 1999). Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tiólicos es debida a su átomo de azufre, el cual fácilmente puede reacomodar su estructura y compensar la pérdida de un electrón (Karoui et al., 1996). Es de esta manera que se pueden producir especies radicales sulfuro como el radical tiolil (GS•) que pudieran estar en proporciones más altas que otros radicales generados durante un periodo de estrés. La reacción del glutatión con un radical libre puede ser descrita de la siguiente manera:



Los radicales generados podrían dimerizarse y formar el glutatión oxidado de la siguiente manera:



El GSSG puede acumularse en el interior de la célula y al ser relacionado con el GSH se puede obtener un radio GSH/GSSG que es una buena determinación para estimar el estrés oxidativo en un organismo (Hwang et al., 1992). De lo anterior se puede deducir que altos niveles de GSSG pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas para producir proteínas-glutatión disulfuro:



La reacción del GSSG con las proteínas produce proteína-SSG, que tiene tiempos de vida media más altos, lo que pudiera tener como consecuencia proteínas mal plegadas. La principal característica del GSH es que puede servir de cofactor de diferentes enzimas detoxificantes contra el estrés oxidativo, como es el caso de la GPx y la glutatión-S-transferasa (GST), entre otras. El GSH participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, reacciona directamente con el radical hidroxilo y el singulete de oxígeno, detoxifica el peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos por la acción catalítica de la

glutación peroxidasa. El GSH también es capaz de regenerar moléculas antioxidantes como las vitaminas C y E; puede reducir el radical tocoferilo de la vitamina E directamente o indirectamente vía la reducción del semidehidroascorbato a ascorbato. Su capacidad para regenerar las otras moléculas antioxidantes importantes está relacionada con el estado redox celular definido por el ratio GSSG/2GSH. Este mecanismo tiene un alto impacto sobre el ambiente celular. Los valores medios celulares del potencial reductor para dicho ratio son dependientes del ambiente redox en donde se localicen; de esta manera se ha podido definir que el potencial redox es -180mV en el retículo endoplasmático, mientras que en el citosol es de -232mV (Jones et al., 2000). Podemos entonces hablar de que la compartimentalización del GSH está relacionada con los diferentes estados redox que prevalecen en las diferentes estructuras subcelulares. El GSH protege a las células contra la apoptosis, lo que está determinado por diferentes mecanismos multifactoriales que involucran la detoxificación y la modulación del estado redox celular, así como por la sensibilidad a las diferentes vías de señalización y su interacción con pro y anti señales apoptóticas (Masella et al., 2005). De ahí la importancia de los niveles de GSH como un factor en la protección contra la apoptosis.

#### 1.2.5 Paraoxonasa (esterasa A)

Existen mecanismos enzimáticos que interrumpen el proceso de lipoperoxidación de los cuales se han descrito dos familias de proteínas: las carboxilesterasas y paraoxonasas (esterasas A). A estas últimas también se les han denominado genéricamente como grupo PON, de las cuales existen un subgrupo denominado PON-1, PON-2 y PON-3, el nombre de paraoxonasa se debe al sustrato utilizado para poder cuantificarla, el paraoxón,

La paraoxonasa se encuentra asociada a las HDL (Figura 1), es dependiente de calcio y se le confieren propiedades antioxidantes sobre las LDL (Ferreti et al., 2001, Aviram et al., 1998). La Paraoxonasa es capaz de hidrolizar cierto número de sustratos, como el paraoxón, fenil acetato, peróxidos de lípidos esteres de colesterol, hidroperóxidos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin embargo su sustrato fisiológico es desconocido (Macknes et al, 1996). La paraoxonasa realiza una actividad protectora importante para el organismo, ya que hidroliza los hidroperóxidos formados durante la lipoperoxidación de las LDL, de esa forma interrumpen la continuidad reactiva de una cadena de lipoperoxidación o daño oxidante de ácidos grasos insaturados, que se ha iniciado debido a la inducción del proceso por el radical hidroxilo.

La paraoxonasa es una enzima inducible y, en consecuencia, su actividad es mínima en individuos con dietas ricas en ácidos grasos saturados, mientras que se incrementa en

presencia de un aporte enriquecido en ácidos grasos insaturados. Se ha demostrado que la administración de vitamina E induce y aumenta su actividad.

Fig. 1 Molécula de HDL. En la parte superior de la lipoproteína se representa a la Apo-I, que esta asociada a otra proteína: la enzima esterasa A (paraoxonasa).

### 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo, se define como el desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes a favor de un daño potencial <sup>(William, 2000)</sup>. Con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas o niveles de evolución o intensidad (adaptación, agudo y crónico), tomando en consideración, las características del daño estructural y funcional de las diversas biomoléculas, así como al tiempo de exposición a las ERO.

#### *1.3.1 Adaptación al estrés oxidante*

La adaptación es la respuesta de la célula o del organismo para equilibrar por medio de procesos de sobre expresión genética y activación enzimática la sobreproducción de especies reactivas que ya han superado a los sistemas antioxidantes estableciendo las condiciones de estrés oxidante. El resultado de la adaptación, es una protección parcial o total contra el daño el cual no es cuantificable e incluso puede llegar a crear una condición de resistencia a niveles intensos y constantes. En esta etapa ya existe el estrés oxidante dado que se superaron los mecanismos antioxidantes. En contraste, cuando no es posible lograr esta adaptación o se agota la sobreexpresión antioxidante, se presenta el daño que puede ser de intensidad y duración muy variable.

#### *1.3.2 Estrés oxidante agudo*

Proceso mediado principalmente por las ERO; como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, (ovulación, mecanismos de defensa etc.), pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suele acompañar también a procesos crónicos.

### 1.3.3 Estrés oxidante crónico

Proceso mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular.

## 1.4 DAÑO A BIOMOLÉCULAS

### 1.4.1 Oxidación de Lípidos (Lipoperoxidación)

La lipoperoxidación principia con el ataque de un radical libre a alguno de los carbonos vecinos a los dobles enlaces de los ácidos grasos no saturados debido a que la unión carbono-hidrógeno se debilita por la presencia de un doble enlace carbono-carbono. El radical  $HO^{\bullet}$  sustrae un hidrógeno ( $H^{\bullet}$ , protón y electrón) que constituía un enlace covalente ( $C^{\bullet}H$ ) en la cadena del ácido graso, dejando el carbono con un solo electrón dando lugar a un radical orgánico.

A continuación se presenta un rearrreglo interno que resulta en que el carbón vecino queda como radical orgánico ( $C^{\bullet}$ ). El átomo de carbono transformado en un radical dentro del ácido graso, tiende a estabilizarse mediante un rearrreglo molecular (Figura 2) para producir un dieno conjugado (dobles enlaces en arreglo secuencial).

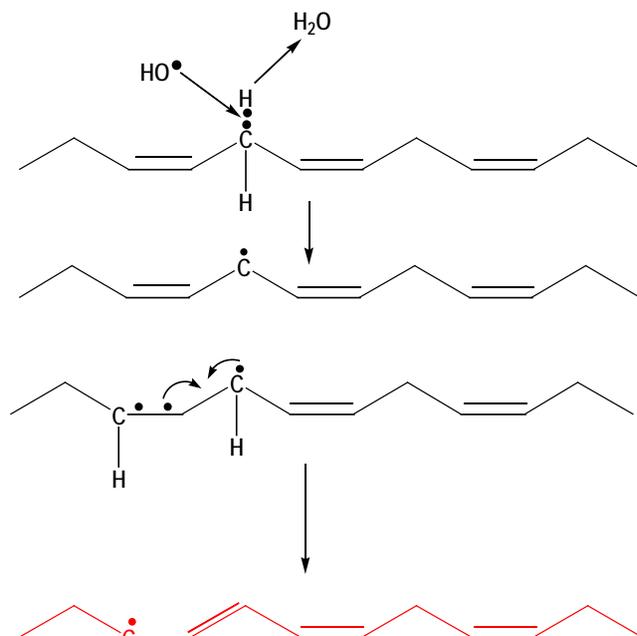


Figura 2. Fase de Iniciación en el proceso de lipoperoxidación.

El radical formado en la cadena del ácido graso, reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> para dar origen a un radical peróxido:

Tanto los radicales *peróxidos* como los *alcóxidos* estimulan la reacción en cadena al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos en una reacción similar a la que realiza el hidroxilo. Por la adición de un hidrógeno al peróxido, se forma, un hidroperóxido (Figura 3). Los hidroperóxidos lipídicos son moléculas relativamente estables, pero algunos compuestos de hierro reducido catalizan su descomposición (reacción de tipo Fenton) para dar origen a radicales alcóxido (Lipido-O•):

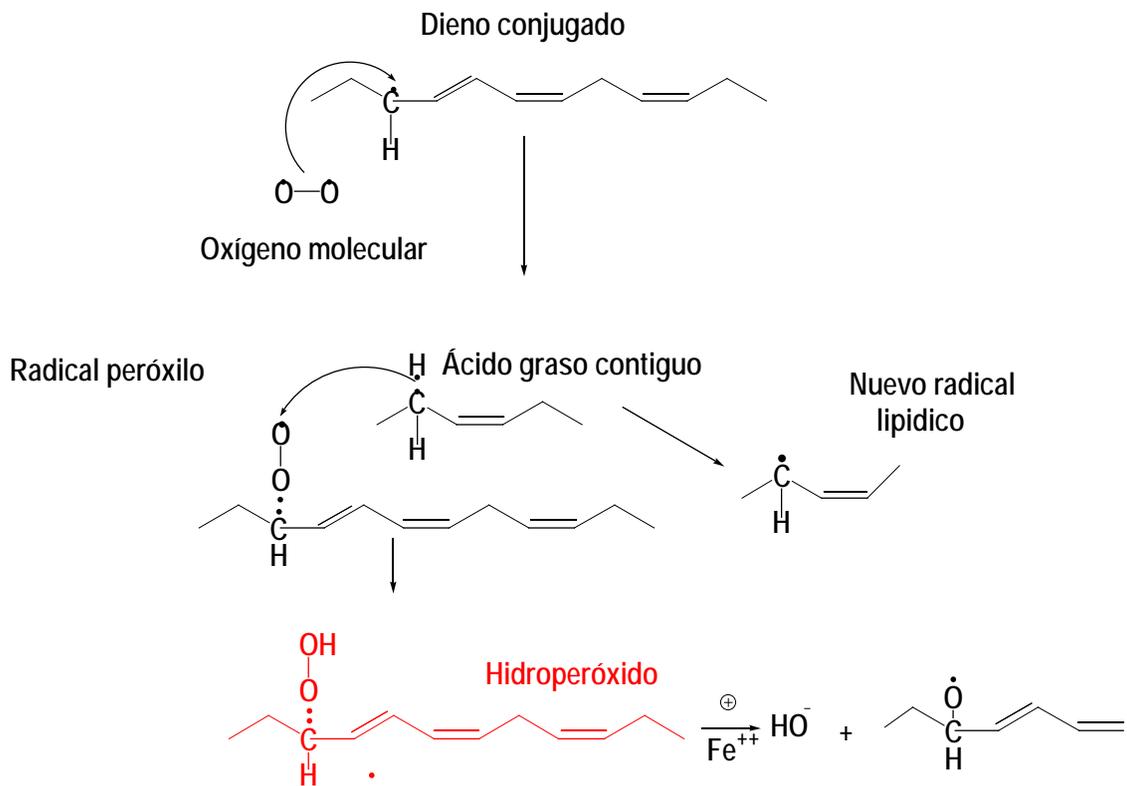


Figura 3. Fase de Propagación en el proceso de lipoperoxidación

Los radicales alcóxilo y peróxilo estimulan la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica al extraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos no saturados. Como productos finales de la lipoperoxidación se generan cetonas, ésteres, alcoholes y aldehídos, en la figura (Figura 4) se muestra la formación de Malondialdehído (MDA) como uno de los productos finales de la lipoperoxidación.

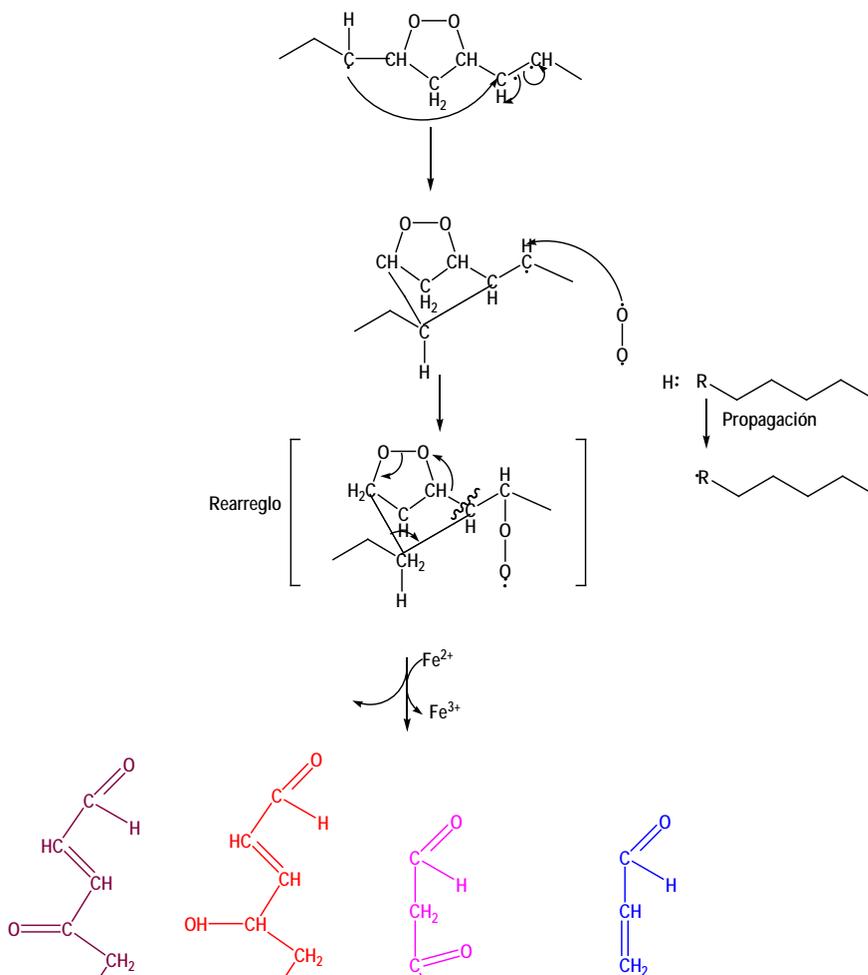


Figura 4. Fase de Terminación en el proceso de lipoperoxidación.

#### 1.4.2 Oxidación de proteínas

La exposición de las proteínas a los sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones de su estructura terciaria que, a su vez, puede dar lugar a pérdida de la función proteica. Las modificaciones estructurales de las proteínas, así como de los lípidos, pueden manifestar una capacidad de transferencia del daño a otras moléculas.

El biomarcador de daño a proteína más utilizado es el ensayo de grupos carbonilos (Dalle-Donne et al., 2003, Amici et al., 1989). La exposición de los grupos carbonilos puede surgir como resultado de; a) el ataque directo de los radicales, b) la interacción con metales de transición, c) la glicación o, d) por la formación de aductos entre proteínas y algunos productos de la lipoperoxidación (malondialdehído, 4-hidroxi-nonenal).

#### 1.4.3 Oxidación de ácidos nucleicos

La interacción de las especies reactivas con los ácidos nucleicos puede conducir al rompimiento de una cadena de polinucleótidos, eludiendo al sistema de reparación y al presentar una mutación antes de la replicación (Luczaj, 2003). La desoxirribosa del DNA es también blanco para el ataque del HO<sup>•</sup>. El centro preferente de ataque es el C-4, en el que presenta una sustracción de un hidrógeno, conduciendo a un arreglo que eventualmente permite la pérdida de la base y el rompimiento de la cadena con dos tipos de terminaciones: fosforilo y fosfoglicolato (Fraga et al., 1990, Olivares et al., 2006).

El daño a biomoléculas como las proteínas y lípidos, son parámetros bioquímicos ampliamente utilizados para determinar la relación del EO con diversas patologías como lo es la EPOC.

Como se menciona anteriormente el estrés oxidativo es un proceso de daño celular, desencadenado por radicales libres, principalmente de oxígeno, que puede afectar uno o varios componentes de la célula (proteínas, carbohidratos, lípidos y/o ácidos nucleicos) y alterar seriamente sus funciones. En los últimos años, este proceso se ha asociado, cada vez con más frecuencia, a los mecanismos patogénicos de diferentes enfermedades como lo es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

## 1.5 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).

La **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)** es una causa importante de morbimortalidad entre las enfermedades crónicas de todo el mundo y su prevalencia y mortalidad se incrementarán en las próximas décadas. Se estima que 60 millones la padecen, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la prevalencia estimada para hombres es de 11.6/1000 y de 8.77/1000 en las mujeres. En la zona metropolitana de la ciudad de México el 7.8% de la población de más de 40 años la padece y se ubica en el 5to lugar de mortalidad.

### *1.5.1 Epidemiología de la EPOC en México*

La EPOC es una enfermedad que va en aumento. Los factores de riesgo más frecuentes causantes de la enfermedad son, en México, el tabaquismo y la exposición a contaminantes ambientales y carbón. La prevalencia es variable de acuerdo con la gravedad. En el estadio 0 (riesgo de EPOC) fue del 23%, mientras que la etapa más avanzada (estadio IV); del 0.3%. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER), fue la cuarta causa de consulta externa de primera vez y se ubico en el 5to lugar de morbilidad y mortalidad hospitalaria en el año 2005.

### *1.5.2 Definición de la EPOC.*

La definición más reciente es la propuesta por las guías de la Iniciativa Global para la EPOC (GOLD: **G**lobal Initiative for Chronic **O**bstructive **L**ung **D**isease) y la define como: "Un estado de enfermedad caracterizado por la limitación de flujo respiratorio que no es completamente

reversible. La limitación de flujo respiratorio es normalmente progresiva y se asocia con la respuesta anormal e inflamatoria de los pulmones a las partículas y gases nocivos”. Por primera vez esta definición engloba la idea de que EPOC es una enfermedad inflamatoria crónica y buena parte de las investigaciones recientes se han centrado en la naturaleza de esta respuesta inflamatoria (Di Stefano, 2002).

### 1.5.3 Clasificación de la EPOC

Es importante determinar la gravedad de la enfermedad, porque de acuerdo con ésta se podrá dar un tratamiento y pronóstico adecuado.

El mismo consenso del GOLD ha propuesto una nueva clasificación (Tabla 1) que considera la gravedad de la enfermedad, porque además de la función pulmonar, incluye síntomas. En este sentido, la disnea desempeña un papel primario para que un paciente pase de un estadio a otro (Repine, 1997).

Tabla 1. Clasificación clínica funcional de la EPOC

De

GRADO	CARACTERISTICAS
0	Síntomas (pero no disnea). Espirometría normal
I	Síntomas con FEV <sub>1</sub> normal pero FEV <sub>1</sub> /FVC < 70%
IIA	Síntomas con FEV <sub>1</sub> > 50%
IIB	Síntomas con FEV <sub>1</sub> > 30% y < 50%
III	FEV <sub>1</sub> < 30%, ó 50% con presencia de insuficiencia respiratoria (PaO <sub>2</sub> < 55 mmHg con o sin PaCO <sub>2</sub> > 50 mmHg) y/o presencia de <i>Cor Pulmonale</i>

acuerdo a la GOLD. Tomado de Romain A, Sonia Buist, Meter M. A, Calverley, Christine R, Jenkins, and Suzanne S. Hurd. Am J Respir Crit Care Med; 163: 1256-1276, 2001.

#### 1.5.4 Patogénesis de la EPOC

La EPOC se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio crónico que afecta las vías aéreas, el parénquima y la circulación pulmonar.

En pacientes con EPOC se han observado alteraciones de células inflamatorias circulantes, neutrófilos y linfocitos. Debido a su participación en la respuesta inflamatoria <sup>(Hoffmeyer et al., 2009)</sup>. Los neutrófilos circulantes responden al estímulo de un factor quimiotáctico con mayor respuesta quimiotáctica y tienen mayor capacidad proteolítica. Esto sugiere que, aunque se produzcan cantidades normales de factores quimiotácticos en el pulmón, la respuesta de los neutrófilos puede ser excesiva y, con el tiempo, provocar una mayor acumulación de estas células en el órgano y mayor destrucción tisular. Otros estudios han demostrado mayor expresión de la molécula de adhesión Mac-1 en los neutrófilos circulantes de pacientes con EPOC y mayor producción de especies reactivas de Oxígeno (ERO) a través del estallido respiratorio. Uno de los primeros procedimientos que tiene lugar en la respuesta inflamatoria es un cambio cualitativo en las interacciones entre neutrófilos circulantes y endotelio vascular. En condiciones normales, los neutrófilos interactúan poco con el endotelio pues determinados factores hemodinámicos e interacciones electrostáticas tienden a mantenerlos lejos de la pared vascular <sup>(Bathoorn et al., 2009)</sup>. Oponiéndose a estas fuerzas dispersantes, la expresión de moléculas de adhesión específicas en la superficie de neutrófilos y endotelio favorece la adhesión leucocitaria <sup>(Morgan and Rashid et al., 2009)</sup>, que permitirá que estos neutrófilos atraviesen el endotelio vascular y lleguen al foco inflamatorio.

La inflamación sistémica asociada a la EPOC puede ocasionar la aparición de algunos cuadros de anemia <sup>(Schols and Wouters et al., 2000)</sup>. En los últimos años se ha demostrado que la EPOC, acarrea efectos extrapulmonares, entre los que destacan la pérdida de masa y la disfunción muscular esquelética (DME), producto de la hipoxia tisular presente en estos pacientes.

#### 1.5.5 Hipoxia Tisular

Se cree que la hipoxia tisular puede ser una de las causas de DME en la EPOC, <sup>(Kent et al., 2011)</sup> por los siguientes motivos: a) La hipoxia crónica suprime la síntesis proteica y la pérdida neta de aminoácidos y fibras musculares; b) Se han identificado cambios estructurales en el músculo, como disminución del área de sección transversal de las fibras musculares y disminución de la expresión de la cadena pesada de la miosina ; c) La hipoxia debida a la

altitud también provoca pérdida de masa muscular, y d) en el cuádriceps de pacientes con EPOC se han observado alteraciones estructurales y funcionales en proporción directa al grado de hipoxemia arterial presente.

Se ha demostrado una relación directa entre el grado de hipoxemia arterial y la actividad de la enzima citocromo oxidasa (enzima clave de la cadena respiratoria mitocondrial que acopla al oxígeno (O<sub>2</sub>) a los electrones y protones para formar agua como producto de la respiración) en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. Esta observación tiene relación con el gasto energético basal (GEB) porque la citocromo oxidasa es la enzima mitocondrial causante del VO<sub>2</sub>, a su vez causante directo del GEB (Santiworakul et al., 2009). Los linfocitos de pacientes con EPOC también presentan aumento de esta enzima, lo que indica que esta alteración bioenergética puede afectar a otros órganos.

La pérdida de peso es un factor pronóstico importante en los pacientes con EPOC y su valor pronóstico es independiente de otras variables pronósticas, como el FEV<sub>1</sub> o la PAO<sub>2</sub>, que informan sobre el grado de disfunción pulmonar. Por lo tanto, es importante considerar la pérdida de peso como una variable sistémica de valor pronóstico en la EPOC (Raguso et al., 2004). En este sentido, es destacar que el pronóstico de esta enfermedad mejora al recuperar peso con tratamiento adecuado sin cambios en la función pulmonar. Por lo tanto, estos datos indican que en la evaluación clínica de los pacientes con EPOC debería tenerse en cuenta para evaluar la severidad de la enfermedad y las consecuencias sistémicas extrapulmonares, donde la pérdida de peso desempeñaría un papel importante.

#### *1.5.6 Mecanismos de compensación de la EPOC a la hipoxia*

a) Disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este es uno de los ajustes más precoces y posibilita una mayor extracción de oxígeno a nivel de los tejidos.

b) Redistribución de la perfusión. La redistribución de la sangre desde tejidos con bajos requerimientos de oxígeno, como la piel, a otros, como miocardio y cerebro, provee de un mecanismo eficaz de protección a estas estructuras vitales.

c) Aumento del gasto cardiaco. Su aumento en respuesta a la hipoxemia, debido a un aumento de la frecuencia cardiaca y del gasto sistólico, es un eficaz mecanismo de compensación aunque no aparece hasta que los niveles de hemoglobina caen bajo 7g/dL.

d) Aumento de la producción de eritrocitos. El mecanismo compensatorio más eficaz, pero más lento, es el aumento de la masa eritrocítica. La hipoxia tisular debida a la anemia provoca un aumento en la producción de eritropoyetina, que estimula la eritropoyesis.

Estos mecanismos de compensación son de vital importancia debido a que el organismo necesita oxígeno para que las células puedan ejercer su función respiratoria y generar ATP, por lo que una oxigenación deficiente provoca hipoxia tisular y alteraciones funcionales en las células. Como consecuencia de este estrés se presentan modificaciones estructurales y funcionales en prácticamente todos los sistemas celulares y tejidos. Esto incluye a los eritrocitos, en los que hay una disminución de su capacidad para transportar y difundir oxígeno hacia los tejidos.

### *1.5.7 Factores de riesgo para padecer EPOC*

#### 1.5.7.1 Tabaquismo

Es el factor de riesgo más frecuente; a mayor intensidad, el riesgo aumenta y la proporción hombre:mujer, ha tenido modificaciones debido a que el número de mujeres fumadoras va en aumento. Uno a dos de cada 10 fumadores susceptibles desarrollara la enfermedad.

#### 1.5.7.2 Humo de Leña

Factor de riesgo frecuente en la población mexicana, y esta exposición debe investigarse en mujeres que viven en el campo y que han cocinado con leña u otros materiales en espacios cerrados por décadas. El riesgo exposición al humo de leña u otros biomateriales para adquirir EPOC es a partir de 200 horas/año.

#### 1.5.7.3 Exposición laboral.

La exposición laboral a polvos, humos, gases y sustancias químicas pueden ser causa de EPOC. En estados Unidos, la causa laboral es del 19%. Los trabajadores más afectados son los de industrias manufactureras del caucho, plástico, piel, construcción, fábricas textiles, fuerzas armadas y la elaboración de productos alimenticios.

#### 1.5.7.4 Contaminación ambiental

La exposición crónica al material particulado (PM), ozono y a gases o químicos, como el humo y dióxido de sulfuro emanados del tráfico, incrementa su riesgo de desarrollar EPOC y puede empeorar los síntomas de la enfermedad.

## 1.6 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La definición más adecuada de contaminación ambiental es la que se refiere a la acción de alterar nocivamente la pureza o las condiciones normales de un ambiente o un medio por

agentes químicos o físicos (Pekkanen et al 2002). Las formas principales y más frecuentes de este proceso se manifiestan en la calidad del aire, el agua y de la tierra.

Los agentes contaminantes se pueden clasificar de dos maneras: considerando la fuente que los origina, o dependiendo del lugar donde se localizan, aunque algunos contaminantes pueden encontrarse en ambos escenarios (Ghio et al., 2011).

Generalmente, los individuos pasan la mayor parte del tiempo en lugares cerrados como en las viviendas, trabajo, escuelas, etc. El porcentaje de tiempo que las personas pasan fuera de estos sitios es solo del 10 al 20% (Weichenthal et al, 2011). La contaminación en los ambientes cerrados casi siempre está más concentrada que en el exterior. La acumulación de los contaminantes intramuros en países en vías de desarrollo se debe principalmente a una ventilación inadecuada, producto de la pobreza, falta de inversión en tecnología. Pero también propiciada por una legislación ambiental deficiente (Polivka et al 2011).

### *1.6.1 Contaminantes de la atmosfera*

La posible afectación para los seres vivos de los diversos contaminantes de la atmósfera depende de los Contaminantes de la atmósfera los cuales son:

#### 1.6.1.1 Material particulado

Las PM son una mezcla compleja de partículas, ya sea sólidas o líquidas, que incluyen ácidos inorgánicos, humos, polvo fino, residuos de plomo y asbestos, carbón elemental; así como una gran variedad de metales, los cuales permanecen suspendidos en el aire por horas o días, especialmente durante el invierno, durante el cual se presenta el fenómeno llamado inversión térmica (Steenhof et al, 2011). Las actividades que elevan la cantidad de partículas son la combustión de biomasa (materia orgánica, combustibles fósiles), la limpieza y la renovación.

Las PM se clasifican de acuerdo con su diámetro en: PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> y ultrafinas PM<sub><0.1</sub>. (Figura 5) Las partículas con diámetro mayor de 10 a 15µm no penetran en los mamíferos superiores más allá de la vía aérea superior. Están constituidas por pólenes y polvos de origen natural provocado por la resuspensión de suelos.

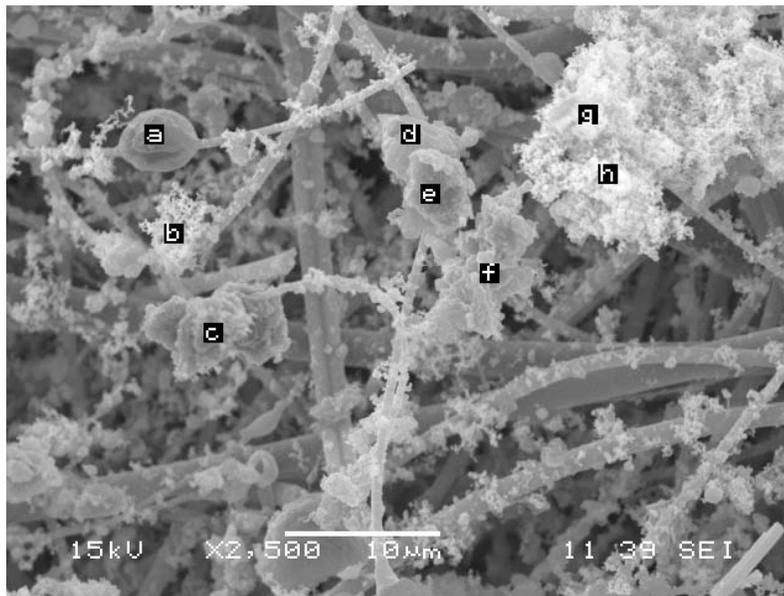


Figura 5. Microscopia electrónica de reflexión de superficie de Material Particulado (PM)

La combustión de materiales orgánicos y los procesos industriales generan las partículas menores de  $10\ \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ), denominadas fracción gruesa, las cuales resultan de la condensación de gases, humos y vapores; actividades de molienda. Su composición química se caracteriza por la presencia de elementos de la corteza terrestre (sílice, aluminio, hierro) (Betts et al., 2011). Durante la inhalación puede depositarse en las regiones más altas del aparato respiratorio. Por su tamaño, que es relativamente grande, tienen una velocidad de sedimentación alta y son removidas del aire en horas.

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

Existe un último grupo de partículas, las ultrafinas (UFP), las cuales tienen un diámetro menor a  $0.1\ \mu\text{m}$ . Se distinguen por tener una mayor posibilidad por su tamaño para depositarse en el pulmón estableciendo una mayor superficie de contacto. Las UFP tienen una forma especial. Ya que constituyen conglomerados que no son estructuras esféricas; debido a su tamaño son transportadas a través de grandes distancias y tienen las características de absorber otros contaminantes tóxicos, incluyendo gases.

### 1.6.2 Efectos en la Salud por Contaminantes Atmosféricos

Las numerosas investigaciones realizadas en todo el mundo han evidenciado una asociación positiva entre la concentración de los contaminantes en el aire (material particulado, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO y O<sub>3</sub>) y efectos negativos en la salud de las personas.

Con referencia a los compuestos orgánicos volátiles y los hidrocarburos policíclicos aromáticos, no ha sido bien documentada su asociación con el impacto en salud.

Los grupos más susceptibles a los efectos adversos de la contaminación del aire son los niños, los ancianos y aquellas personas que padecen enfermedades pulmonares.

Los efectos en la salud incluyen incremento en los síntomas respiratorios, disminución y consultas médicas por enfermedades respiratorias, incremento en la morbilidad respiratoria, en el ausentismo laboral y escolar por restricción de las actividades, en la mortalidad por enfermedades pulmonares. (Cirera et al, 2011)

Sin tener unos estándares o límites concretos que permitan identificar cuando se presentan efectos adversos. La American Thoracic Society (ATS) sugirió algunos factores de riesgo los cuales podrían permitir definir un efecto respiratorio negativo por exposición a contaminación ambiental (Kelly et al., 2011).

- Efectos en la mortalidad
- Efectos perceptibles clínicamente
- Cualquier efecto perceptible en pérdida permanente de la función pulmonar.
- Disminución de la calidad de vida relacionada con la salud.
- Pérdida reversible de la función pulmonar, en combinación con la presencia de síntomas.

La contaminación atmosférica constituye un problema ambiental debido a la acción antrópica que genera un efecto sobre un componente ambiental (aire) y el deterioro de éste afecta la supervivencia y calidad de vida del hombre (Peña-Cortés & Henríquez, 2002). Al respecto, la Sociedad Americana de Tórax define los efectos adversos sobre la salud respiratoria como: cambios fisiológicos o patológicos, evidenciados por uno o más de los siguientes puntos: a) interferencia con la actividad normal de las personas afectadas, b) enfermedad respiratoria episódica, c) enfermedad incapacitante, d) daño respiratorio, y/o e) difusión respiratoria progresiva (Bello, 1988; Bello & Oyarzún, 1991; Martínez, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1994 definió efecto adverso como: Cualquier cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o lapso de la vida de un organismo, que resulta en un perjuicio de la capacidad funcional, o perjuicio en la capacidad

de compensar un estrés adicional, o aumento en la sensibilidad a los efectos dañinos de otras influencias ambientales (Belleudi et al., 2011)

La exposición de los seres humanos ocurre generalmente en algunos casos por periodos cortos u ocasionales a gran cantidad de contaminante lo que se consideraría una exposición aguda o durante un tiempo prolongado en concentraciones bajas (exposición crónica).

El problema de la exposición crónica plantea un problema de percepción debido a que los signos y síntomas no tienen una manifestación grave, pasando desapercibidos o ser fácilmente confundidos con otro tipo de enfermedad (rinitis, virosis respiratoria, alergia respiratoria, sinusitis, faringitis alérgica, bronquitis inespecífica etc.). Su manejo implica consecuencias económicas para el sistema de seguridad social, el trabajador, su familia y el sistema económico (incremento del número de consultas, incapacidades etc.).

En la exposición crónica se da otro problema, la mezcla de contaminantes, los cuales en combinación conllevan la interacción de diversas sustancias entre sí generándose situaciones de potenciación de los efectos, adición o incremento de estos o posiblemente en algunos casos, antagonismo de efectos lo que disminuiría el efecto en la persona expuesta.

Lo anterior plantea que en ningún momento se deben considerar que existen concentraciones sin riesgo, pues al existir mezcla de contaminantes, al desconocer sus efectos aditivos o potencializadores como mezcla y al desconocer que tiempo se tiene de exposición para la aparición de efectos, el riesgo no tiene una medida que permita identificar la presencia de posibles efectos (Kreyling et al., 2000)

Los estudios epidemiológicos proveen evidencia derivada de poblaciones humanas bajo situaciones reales. Estos estudios son útiles para caracterizar la relación que pueda existir entre un incremento de concentración de un contaminante y el cambio en el riesgo de que se presente un efecto en salud asociado. Por ejemplo un estudio llevado a cabo en seis ciudades estadounidenses encontró que por cada incremento de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en partículas suspendidas con diámetro aerodinámico menor a 2.5 micras, el índice de mortalidad incrementaba en un 1.5% (Schwartz et al, 2002). Esta evidencia epidemiológica vinculando efectos en salud con contaminantes atmosféricos ha crecido enormemente en las últimas décadas. Los primeros estudios se enfocaron en caos severos de contaminación como los episodios en Mouse Valley, Bélgica en 1930 (Firket, 1931); en Donora Pensilvania en 1948 (Ciocco et al., 1961); y en Londres Inglaterra en diciembre de 1952 (Logan 1953). En estos estudios no se conto con suficiente información sobre la concentración o identidad de los contaminantes atmosféricos, pero los incrementos en mortalidad y morbilidad fueron lo suficientemente notorios para demostrar los efectos en salud de la contaminación atmosférica. A principios de los años 90,

nuevos estudios epidemiológicos empezaron a mostrar efectos en salud aún en concentraciones de contaminación consideradas bajas. Entre 1993 y 1994, los investigadores Dockery y Pope publicaron varios estudios mostrando efectos en salud, a corto y a largo plazo, por contaminantes como ozono (O<sub>3</sub>), bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) y material particulado (PM) (Dockery et al., 1993; Dockery et al., 1994; Pope et al., 1995b; Pope et al 2002). Consecuentemente, la contaminación atmosférica se reconoció como un problema de salud pública.

### *1.6.3 Efectos en la Salud por Material Particulado*

El tamaño del material particulado es de gran importancia, tanto en términos de su transporte y destino en la atmósfera, como en términos de la facilidad con la que penetran en los organismos. Así, mientras más pequeñas son las partículas, no solo su poder de penetrar en las vías respiratorias y en los pulmones es mayor, sino que adicionalmente la proporción se superficie respecto de su volumen es mayor, sino que adicionalmente la proporción se superficie respecto de su volumen es mayor, aumentando con ello la probabilidad de que la partícula entre en contacto con el organismo e incrementando los riesgos de daño a tejidos y órganos (Belleudi et al, 2010).

Recientes estudios han reportado que existe asociación entre la contaminación por material particulado y la tasa de mortalidad de las personas. Sin embargo la primera voz de alerta surgió el año 1943 en la Ciudad de los Ángeles cuando una gruesa capa de humo y gases cubrió el centro de la ciudad. Posteriormente el mismo problemas se extendió a otras urbes como Nueva York, Pittsburgh, Ciudad de México, entre otras (Dockery et al ,1993). En estos episodios se han observado síntomas respiratorios de tipo irritativo, obstrucciones respiratorias y elevadas tasas de mortalidad, y aumentar las enfermedades cardíacas, e incluso llegan a causar cáncer y muerte prematura en la personas (Dockery et al ,1993). En un interesante estudio, Diociaiuti et al, 2001, encontraron que las células macrófagos pierden viabilidad por la acción del material particulado en sus paredes celulares, generando un estrés oxidativo en la membrana celular. En un día brumoso, una persona puede incorporar 1 millón de partículas en cada inspiración de aire. En estados unidos 10 millones de personas viven en áreas que exceden los estándares de salud nacionales para material particulado. Una investigación realizada en 20 ciudades coreanas, encontró que el riesgo de mortalidad en la población aumentaba entre un 0.5-4% cuando la concentración de partículas era de 100 µg/m<sup>3</sup> con un evento de 2 días (Lee et al, 2000).

Muchos estudios epidemiológicos han explorado los efectos en salud del material particulado definido únicamente por el tamaño; sin embargo, es posible que las partículas del mismo tamaño tengan distintos efectos en salud, dependiendo de su origen y composición química. Existe evidencia que indica que las partículas provenientes de los procesos de combustión son más nocivas que aquellas de origen geológico.

Específicamente, las partículas producidas en la combustión interna de vehículos automotores han sido consideradas como las más peligrosas para la salud (AIRNET WorkGroup 2, 2004; Katsouyanni et al., 2001; Clancy et al., 200; Laden 2000; Hoek et al., 2000). Sin embargo, existen estudios recientes que han encontrado que las partículas de origen geológico, que generalmente se consideran entre las PM<sub>10</sub>, también contienen componentes tóxicos (Alfaro-Moreno., 2002).

La exposición a material particulado está asociada con efectos a corto y a largo plazo. Algunos estudios epidemiológicos de series de tiempo han encontrado que los incrementos en concentraciones de material particulado están asociados con aumentos, a corto plazo, de casos de mortalidad y admisión a hospitales por condiciones respiratorias y cardiovasculares (Kunzli et al 2002; Pekkanen et al., 2002; Peters et al., 2000). Sin embargo, los efectos a corto plazo reportados en estos estudios representan efectos principalmente en individuos que ya se encontraban delicados o con alguna afectación en salud anterior a la exposición. Otros estudios de cohorte, como los de Pope et al. 2004 y Dockery 2001, han investigado los impactos en salud asociados con la exposición prolongada a material particulado, encontrando una relación a largo plazo con mortalidad cardiovascular, mortalidad cardiopulmonar y cáncer de pulmón (Dockery et al., 1993, Pope et al.,1995, Pope et al., 2002). Otros estudios han identificado esta asociación especialmente con la fracción fina del material particulado (PM<sub>2.5</sub>) (Pope et al 1995, Schwartz et al.,2002, Pope et al., 2002; McDonnell et al., 2000, Pope et al 2004, Dockery et al., 1993). Así mismo, no hay evidencia de que exista un umbral, a nivel poblacional, bajo el cual no haya impactos en salud por la exposición a material particulado.

Los resultados de estudios toxicológicos con animales de laboratorio y voluntarios humanos han mostrado que el material particulado puede afectar el funcionamiento de los pulmones, vasos sanguíneos y corazón (Donaldson et al 2002; Ghio et al 2004; Kreyling et al 2000). Estos estudios han mostrado exacerbación de síntomas entre individuos con condiciones preexistentes a la exposición, tales como, Asma, EPOC, estos efectos son ocasionados por irritación pulmonar, trastornos en el ritmo cardiaco, alteraciones en la viscosidad sanguínea y la privación de oxígeno (Stenfors et al 2004). Asimismo dichos estudios han sugerido que las principales características que contribuyen a la toxicidad del material particulado son su composición química y su tamaño.

Debido a su importancia, la mayoría de los países han establecido normas que definen los niveles máximos aceptables de concentraciones, bajo las cuales no se observan efectos nocivos. Estos niveles están basados en los efectos que se desea evitar, y en consecuencia existen las normas de nivel primario y las normas secundarias. El criterio utilizado para definir una norma de nivel primario, es la de prevenir efectos agudos o crónicos sobre la salud de los niños, ancianos o personas enfermas, que son los grupos más sensibles de la población (Préndez y Ulriksen, 1993). Las normas secundarias van dirigidas a la protección del ambiente.

Existe evidencia de que el material particulado aumenta el riesgo por muertes y produce el desarrollo de enfermedades respiratorias y cardiovasculares en las personas (Harrison and Yin, 2000). De acuerdo con Belmar en 1993, los efectos de la contaminación atmosférica en los humanos se pueden catalogar como agudos, acumulativos y crónicos, dependiendo del grado de exposición y de los factores propios del individuo. Las partículas ingresan al organismo vía aparato respiratorio, ingresando en mayor cantidad y a mayor profundidad en la medida que disminuyen de tamaño. (Brochard et al, 1990)

Según Préndez en 1993, el material particulado que entra y permanece en los pulmones puede afectar al organismo de maneras distintas. Una de ellas consiste en que las partículas químicamente inocuas interfieren con los mecanismos de limpieza del tracto respiratorio, dificultando la eliminación de otras partículas más nocivas. La otra vía es a través de la introducción de partículas que ya han atrapado gases irritantes, pudiendo estos llegar a los pulmones. Finalmente, esta inhalación de partículas que contienen compuestos tóxicos y que afectan directamente al organismo, entre las que están el cadmio, hierro y plomo entre otros. Las partículas pueden servir de vehículo para introducir al organismo elementos peligrosos debido a la composición química. Un importante número de investigaciones establecen que los daños por efectos del plomo se producen en el sistema nervioso central (Belmar, 1993). La acción del plomo en el embarazo puede producir alteraciones de tipo congénito, puede alterar la memoria en los niños y llegar a producir menor desarrollo mental (Needleman, 1979). Exposiciones prolongadas en personas adultas han demostrado aumentar la presión arterial, con el riesgo para individuos hipertensos (Belmar 1993). La mayor concentración en plomo, es producto de la mayor concentración vehicular (Préndez, 1993, Bilos et al, 2001). Por su parte el azufre ha demostrado tener una gran capacidad irritativa y de desarrollo de episodios de obstrucción bronquial, aumentando el riesgo de desarrollo de conjuntivitis agudas y crónicas. Hay evidencias de que el material particulado derivado de la fabricación del cemento, un material de construcción ampliamente usado a nivel mundial, produce alteraciones de los

cromosomas de humanos expuestos al polvo contaminante. Incluso se observa una mayor incidencia de las alteraciones genéticas a medida que la población va envejeciendo. (Johnson et al., 2011)

Euler en 1988 aseguro que la exposición prolongada a distintos contaminantes atmosféricos favorece el desarrollo de bronquitis obstructiva en las personas. Largas exposiciones en ambientes con dosis sub-letales de contaminantes pueden tener efectos acumulativos y llegar a lesionar el ADN. Lo anterior es uno de los mecanismos responsables de los efectos adversos crónicos de la contaminación por material particulado.

Gil y colaboradores en 1992, realizaron un estudio experimental en ratas para asociar los efectos de la contaminación atmosférica de la Ciudad de Santiago sobre el metabolismo celular, llegando a la conclusión de que hay desarrollo de cáncer del aparato respiratorio y alteraciones cromosómicas como consecuencia de alteraciones enzimáticas.

Dos de los estudios más completos que relacionan partículas finas con mortalidad, son el “Estudio de las Seis Ciudades” de la Universidad de Harvard y el de la Sociedad Americana del Cáncer (ACS), publicados a mediados de los años noventa, a pesar de ser criticados por la industria y por algunos científicos, que pusieron en duda la existencia de una conexión causal entre partículas finas y mortalidad.

Estas críticas, impulsaron otras dos investigaciones: a) un re-análisis de las seis ciudades y el trabajo de la ACS y b) el estudio Nacional de Morbilidad, mortalidad y Contaminación del aire (NMMAPS), que fue una investigación completamente nueva acerca de la hospitalización y muertes asociadas con la contaminación del aire en las mayores ciudades de Estados Unidos (Steenhof et al, 2011)

Los re-análisis hechos por investigadores independientes validaron los estudios originales, confirmando así que se trataba de ciencia con base sólida. Además, el NMMAPS encontró fuerte evidencia, que relaciona el aumento diario de partículas en el aire con aumento en la admisión de hospitalizaciones por enfermedades pulmonares. Estos resultados no dejan duda que la población expuesta a partículas contaminantes ambientales corren un gran riesgo a su salud.

En un principio, los instrumentos de medición muestreaban todo el material particulado que se encontraba en el aire, y por lo tanto, las muestras correspondían a material particulado total en suspensión. La mayoría de la información disponible se refiere a estas mediciones. En los años recientes, teniendo en cuenta la naturaleza más dañina para la salud de las partículas finas, se desarrollaron nuevos instrumentos capaces de recolectar las partículas más pequeñas. El material particulado en suspensión es considerado como uno de los

contaminantes del aire más importantes en términos de sus posibles efectos sobre la salud de las personas. Estudios epidemiológicos evidencian la existencia de asociaciones significativas entre el nivel de la concentración del material particulado en el aire e impactos adversos en la salud <sup>(Who et al., 2000)</sup>. Las partículas más finas son generalmente las que más contribuyen a estos efectos adversos, debido a su capacidad de ingresar más profundamente en los pulmones, alojándose allí y dañando los tejidos involucrados en el intercambio de gases <sup>(Weichenthal et al, 2011)</sup>. Mientras que los efectos del material particulado varían considerablemente dependiendo de su composición y distribución de tamaños, generalmente, la exposición al material particulado inhalable puede causar un aumento en la mortalidad de origen cardiaco y respiratorio, una reducción de los niveles de la capacidad pulmonar en niño y adultos asmáticos con enfermedades crónicas de obstrucción pulmonar. (COMEAP, 1998, Who, 2000)

Las partículas tienen una mayor posibilidad de establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolo capilar por translocación, y en consecuencia pueden causar efectos a nivel sistémico. Dado su contenido rico en compuestos químicos oxirreductores y su habilidad para dañar a la mitocondria, estas partículas producen una gran respuesta inflamatoria en tejidos pulmonares y extrapulmonares, como el endotelio vascular, incluyendo el de los vasos coronarios. El aparato cardiovascular experimenta cambios relacionados con la exposición a este tipo de partículas destacando el aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial. Las modificaciones a la función endotelial y a la estructura vascular se manifiesta a largo plazo, por lo que se reflejan en una disminución en la expectativa de vida fundamentalmente a la aterosclerosis que provoca. El mecanismo de daño también esta asociado a alteraciones en el sistema nervioso autónomo (afecta la conductividad cardiaca), reflejándose incluso en aumentos en la concentración sérica de ciertos marcadores de riesgos cardiovascular, como es el caso de fibrinógeno.

En publicaciones recientes se ha demostrado la asociación entre la contaminación del aire (por partículas y/o CO) y la mortalidad entre la población de riesgo que es la postneonatal, con bajo peso al nacer y parto pretérmino.

Las concentraciones de partículas que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) considera como limite de la norma son de  $65 \mu\text{g} / \text{m}^3$  (promedio 24 horas) y  $15 \mu\text{g} / \text{m}^3$  (promedio anual) para las  $\text{PM}_{2.5}$  y para las  $\text{PM}_{10}$  el promedio anual es de  $50 \mu\text{g} / \text{m}^3$  y de  $150 \mu\text{g} / \text{m}^3$  en 24 horas. Estos valores coinciden con las normas mexicanas.

Los niveles de PM en países en desarrollo son muy grandes, llegando a 1000-2500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en áreas cerradas como son las cocinas en países como Nepal, India, Kenia y China entre otros.

Existe poco conocimiento sobre las consecuencias, respecto a los efectos secundarios por exposiciones prolongadas a niveles de contaminación comúnmente encontrados en las ciudades y si los seres humanos se pueden adaptar a los ambientes contaminados o si la exposición crónica producirá daños irreparables.

#### *1.6.4 Interacción de las PM con vías respiratorias y su relación con el transporte de Oxígeno*

Las partículas contaminantes una vez que entran en contacto con la vía respiratoria superior se llevan a cabo diferentes mecanismos por los cuales las partículas pueden entrar en contacto con la barrera alveolo capilar.

##### Impactación

Se produce cuando la trayectoria del flujo de aire cambia de manera abrupta debido al cambio en la dirección de las vías aéreas. Este representa el principal mecanismo de depósito de las partículas mayores a  $5\mu\text{m}$ .

##### Intercepción

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

##### Sedimentación

Es un mecanismo que depende de la gravedad, y se produce cuando la partícula es balanceada debido a la flotabilidad del aire y a su resistencia. De este modo se depositan las PM 1- $5\mu\text{m}$ .

##### Difusión

Se produce debido al bombardeo de la partícula por las moléculas de gas, provocando un movimiento de tipo browniano, el cual en un momento determinado, hace que la partícula entre en contacto con la pared de las vías aéreas. De este modo se depositan las PM  $<0.5\mu\text{m}$ .

##### Alteración Electroestática

De manera natural, las partículas contienen una carga eléctrica determinada, esto provocara una atracción sobre la superficie de las vías aéreas. Es importante señalar que los mecanismos de depósito no se ejercen de manera específica a nivel de tracto

respiratorio, si no que actúan en combinación y el predominio de unos sobre otros dependiera de las características del PM y del aparato respiratorio.

Dependiendo del nivel en que el PM se depositen podemos dividir esta distribución en 4 fracciones:

Fracción inhalable

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

Fracción extratorácica.

Cantidad de partículas que penetran a nivel de las vías respiratorias superiores hasta la parte superior de la laringe. Partículas con un diámetro 5-10 $\mu$ m.

Fracción torácica.

Cantidad de partículas que se depositan entre la laringe y los bronquios terminales. Partículas con diámetro de 2.5-5 $\mu$ m.

Fracción respirable o alveolar.

Se refiere a la región comprendida desde los bronquios respiratorios hasta los alveolos. Las partículas <2.5 $\mu$ m son susceptibles de depositarse a este nivel.

Las células pulmonares, cuando son estimuladas por PM liberan gran cantidad de ERO. Existen varios mecanismos por lo que las ERO pueden causar alteraciones en el pulmón. En donde se presenta una dificultad de aporte de oxígeno al pulmón y a los tejidos, y un incremento de ERO a nivel pulmonar conduciendo al estrés oxidativo que afecta entre otros sistemas en primera instancia a los eritrocitos (Joppa et al., 2007), dificultando el transporte y la difusión del oxígeno, evento que podría correlacionarse con los eventos extrapulmonares (sistémicos), que se asocian a la EPOC (Rabe, 2007).

## 1.7 ERITROCITO

Uno de los ejemplos más llamativos de la relevancia del proceso evolutivo y la eficiencia de los sistemas biológicos se encuentra en los eritrocitos. Los eritrocitos, son los elementos formes (células) más abundantes de la sangre, cuya función principal es transportar y suministrar el oxígeno a los tejidos, por medio de la [hemoglobina](#).

Los eritrocitos carecen de núcleo y pierden sus mitocondrias en la medida en que maduran, los eritrocitos maduros no poseen una maquinaria celular que les permita obtener energía, (Figura 6), sintetizar proteínas y ácidos nucleicos como el resto de las células del organismo por lo que el eritrocito utiliza vías alternas para mantener estables los niveles de ATP y el



mediante la intervención de la Fosfotirosina Fosfatasa. El descenso de los niveles de ATP hace que desaparezcan los efectos inhibidores sobre las enzimas, reactivándose el proceso glucolítico<sup>7</sup>.

En la ruta glucolítica de los eritrocitos existe una desviación a nivel del 1,3- bisfosfoglicerato (1,3BFG) en la que, a partir de esta sustancia, por acción de la bisfosfoglicerato mutasa, se produce 2,3-bisfosfoglicerato (2,3BFG). Es bien conocido el papel esencial que desempeña el 2,3BFG en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los tejidos<sup>(Maneva and Taleva, 2008, Jacobash and Rapoport, 1996)</sup>, el cual será tratado más adelante.

#### 1.7.1.2 Ciclo de las Pentosas

La vía de las pentosas fosfato en los eritrocitos representa una vía para el metabolismo de la glucosa; sin producir ATP; teniendo dos funciones esenciales, la generación de NADPH utilizado para procesos reductores necesarios para mantener el equilibrio redox y la adecuada reducción de glutatión<sup>(Sergutina, 2009)</sup> y la producción de pentosas fosfato y eritrosa-4-fosfato (síntesis del grupo hemo).

Esta vía tiene una fase oxidativa que es irreversible en la que se genera NADPH + H y una fase no oxidativa, que proporciona precursores de ribosa y otros carbohidratos. La vía completa existe solo en tejidos que requieren NADPH para síntesis reductoras; en tanto que, la fase no oxidativa se encuentra en todas las células que requieren ribosa. En los eritrocitos, la vía tiene la importante función de evitar la hemólisis ya que suministra NADPH para mantener al glutatión en el estado reducido (GSH). A su vez, el glutatión sirve como sustrato de la glutatión peroxidasa, que es esencial para eliminar peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nocivo para la célula. Los oxidantes dentro de la célula oxidan los grupos sulfídrico (SH) de la hemoglobina, a menos que los oxidantes sean reducidos por el GSH. El eritrocito normalmente mantiene una alta proporción NADPH – NADP<sup>+</sup>.

#### 1.7.1.3 Vía de la Metahemoglobina Reductasa

Las hemoglobinas constituyen un grupo de hemoproteínas especializadas en el transporte de oxígeno, bióxido de carbono y protones, están formados por una proteína la globina, que a

su vez se compone de cuatro subunidades o monómeros, los que se organizan en pares de subunidades iguales, dos cadenas alfa y dos cadenas beta. Cada subunidad tiene un grupo hemo, al que se une reversiblemente el oxígeno <sup>(Hashimoto et al., 2008)</sup>. La unión del oxígeno con la hemoglobina es cooperativa y es afectada por diversos factores, como temperatura, pH y algunos efectores alostéricos (2,3-bisfosfoglicerato). Se conoce como efecto Bohr la disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno cuando baja el pH, dicho efecto es importante para facilitar la liberación de este gas en los tejidos. La hemoglobina se encuentra principalmente en dos estados conformacionales: uno completamente oxigenado (oxihemoglobina), de alta afinidad con el oxígeno, o R (estado relajado) y otro desoxigenado, de baja afinidad con el oxígeno o T (estado tenso). El hierro de la hemoglobina enlaza oxígeno solo cuando se encuentra en estado de oxidación ferroso ( $Fe^{2+}$ ), y en el momento en que se oxida al estado férrico ( $Fe^{3+}$ ), el grupo hemo se convierte en una hemina y por su parte la hemoglobina, en una metahemoglobina. La reducción de la metHb se produce básicamente por acción de la enzima citocromo b metahemoglobina reductasa (67% de participación), catalizando la reacción en presencia de dos portadores de electrones, el citocromo b y el NADH+H. La reducción también se produce por otros agentes como el ácido ascórbico (16%), el glutatión (12%) y la enzima NADPH-flavina reductasa (5%). Las pruebas *in vitro* demuestran que la metahemoglobina reductasa es el factor limitante de la reducción de metahemoglobina <sup>(Hicks, 2006)</sup>.

#### 1.7.1.4 Ciclo de Rapoport – Luebering

Este vía implica la interacción con el 2,3-bisfosfoglicerato, (Figura 7) el compuesto fosforilado predominante en el eritrocito <sup>(Hicks, 2006)</sup>. El 2,3-bisfosfoglicerato funciona como un efector alostérico para la Hb. En la conformación desoxi (estructura cuaternaria T, «tenso») existe una cavidad suficientemente grande para admitir a la molécula de 2,3-bisfosfoglicerato entre las cadenas beta. Además, esta cavidad está cargada positivamente, fijando así una molécula de 2,3-bisfosfoglicerato de carga negativa. Cuando la Hb se oxigena, asume una configuración cuaternaria R, «relajada». Los fenómenos moleculares de este cambio no se han establecido totalmente, pero al parecer implica una configuración intermedia entre R y T. La conversión final a su configuración R se inicia con la fijación de una molécula de  $O_2$  a la interacción  $\alpha 1\beta 2$  y se continúa con la eliminación del 2,3-bisfosfoglicerato y la disrupción de los puentes salinos e interacciones hidrófobas en el contacto  $\alpha 1\beta 2$  formados en su forma T <sup>(Hicks, 2006)</sup>. Las variaciones de la concentración del 2,3-bisfosfoglicerato tienen una participación fundamental en la adaptación a la hipoxia, de manera que en la hipoxemia

aumenta en el eritrocito y en consecuencia la afinidad por el oxígeno declina incrementando concomitante al aporte a los tejidos. El 2,3-bisfosfoglicerato está presente en el eritrocito en una concentración de un mol de 2,3-bisfosfoglicerato/mol de hemoglobina y se une con fuerza a la desoxihemoglobina, manteniendo a la hemoglobina en estado desoxigenado facilitando así la liberación del oxígeno.

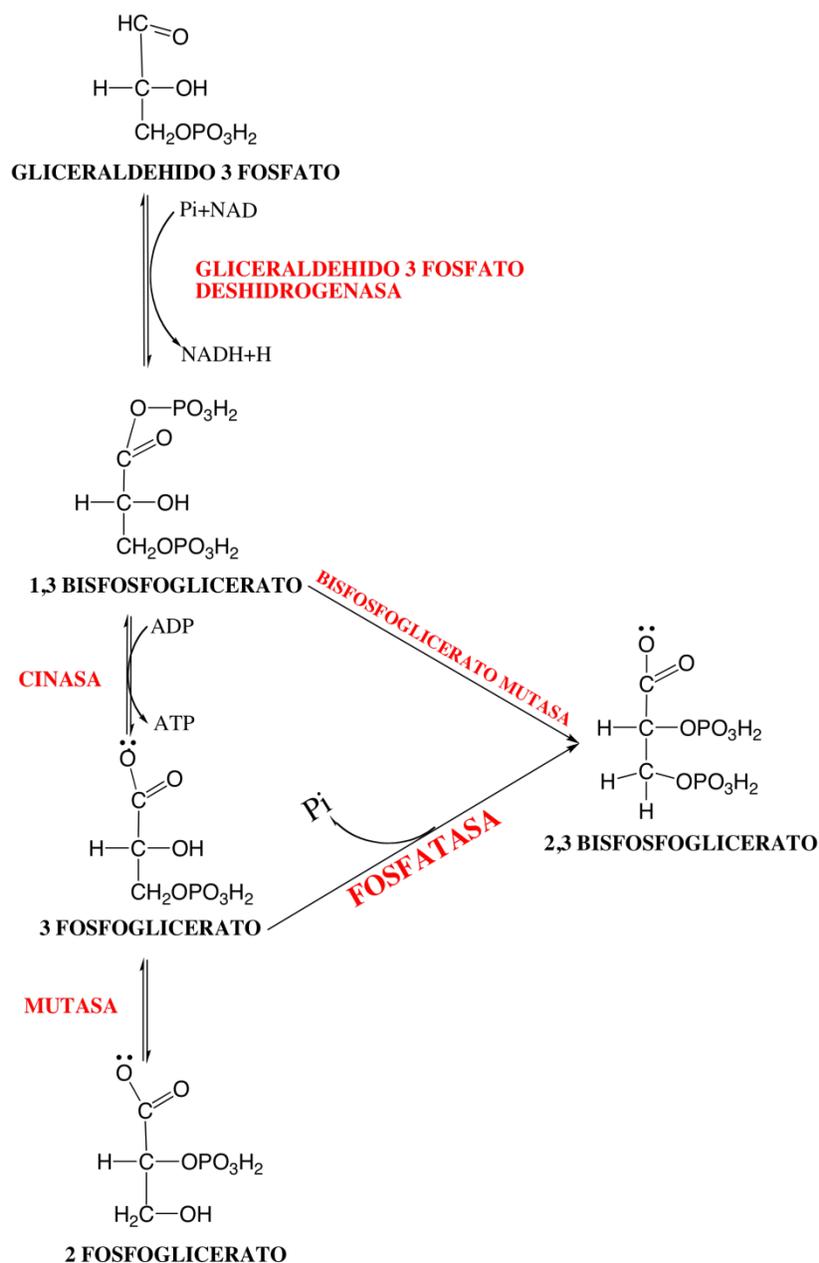


Figura 7. Vía de síntesis y degradación de 2,3-bisfosfoglicerato en eritrocitos.

Además de contar con sistemas antioxidantes eficientes, el eritrocito necesita mantener la integridad de la membrana para llevar a cabo sus funciones biológicas (Steck, 1978).

### 1.7.2 Estructura de la membrana del eritrocito

La membrana del eritrocito es la responsable de la mayoría de las funciones fisiológicas y esta formada por una bicapa lipídica plana, constituida en un 80% por fosfolípidos, colesterol y en menor medida por glicolípidos y aminofosfolípidos, que se encuentran distribuidos asimétricamente (Kay et al., 1991). De igual forma se encuentran embebidas parcial o totalmente en ella las proteínas integrales de membrana, unidas por enlaces hidrofobitos (figura 8).

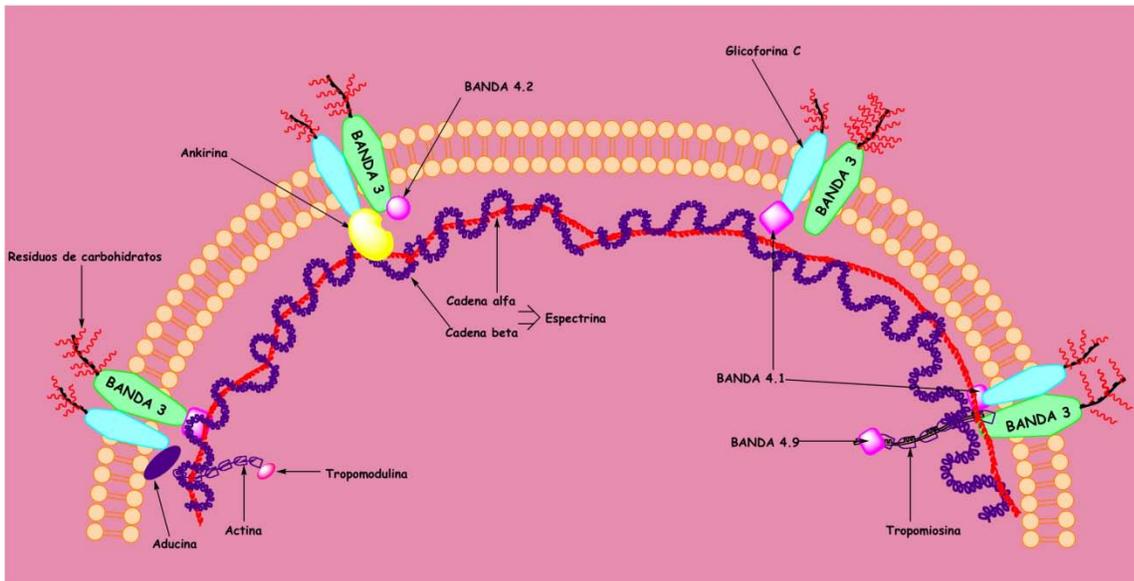


Figura 8. Estructura de la membrana del eritrocito

Su libre desplazamiento a través de esta bicapa contribuye a mantener su fluidez. Las proteínas periféricas interactúan entre sí para formar una malla o enrejado que recubre la cara interior de la doble capa de fosfolípidos y son los responsables de la estabilidad y las propiedades viscoelásticas de la membrana. Entre otras proteínas destacan la espectrina, la ankirina que constituye por su desplazamiento electroforético a las denominadas bandas (2.1, 2.2, 2.3, y 2.6), proteínas de las bandas 4.1. y la banda 4.2, la banda 4.9, aducina, tropomiosina, banda 7, y finalmente la banda 3 que es la proteína intrínseca más abundante en el eritrocito (Wang et al., 1994).

### 1.7.3 Proteínas Banda 3

La banda 3 constituye el elemento central de un macrocomplejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito. Esta proteína fue identificada por primera vez en eritrocitos, y se designó como banda 3 por ser la tercera banda que aparecía en la parte superior del gel de poliacrilamida <sup>(Popov et al., 1999)</sup>, en un proceso de electroforesis.

El intercambiador aniónico de banda 3 (AE1, anionic exchanger 1) (figura 9) tiene un peso molecular aproximado de 95 kDa y es el prototipo de todos los AEs, (intercambiadores aniónicos por sus siglas en inglés) constituido por 911 aminoácidos presenta alrededor de  $1.2 \times 10^6$  copias por célula. Esta proteína multifuncional tiene 3 dominios: un dominio de membrana transversal donde ocurre el intercambio bicarbonato/cloruro ( $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ), un dominio citoplasmático corto C-terminal, y un dominio citoplasmático largo N-terminal. <sup>(Havenga et al.,</sup>

<sup>1994)</sup> El dominio C-terminal citoplasmático de la banda 3 une la anhidrasa carbónica II (CA II), formando un complejo metabólico que permite el paso de bicarbonato en la fase citoplásmica de la banda 3. <sup>(Sterling et al., 2001)</sup> El dominio citoplásmico N-terminal de la banda 3 une a diversas enzimas glucolíticas, hemoglobina y hemicrones, que pueden inducir la agregación de la banda 3 y el recambio celular <sup>(Zhang et al., 2000)</sup>. Una función fundamental del dominio N-terminal de la banda 3 es el anclaje de la membrana eritrocitaria al citoesqueleto subyacente <sup>(Havenga et al., 1994)</sup>.

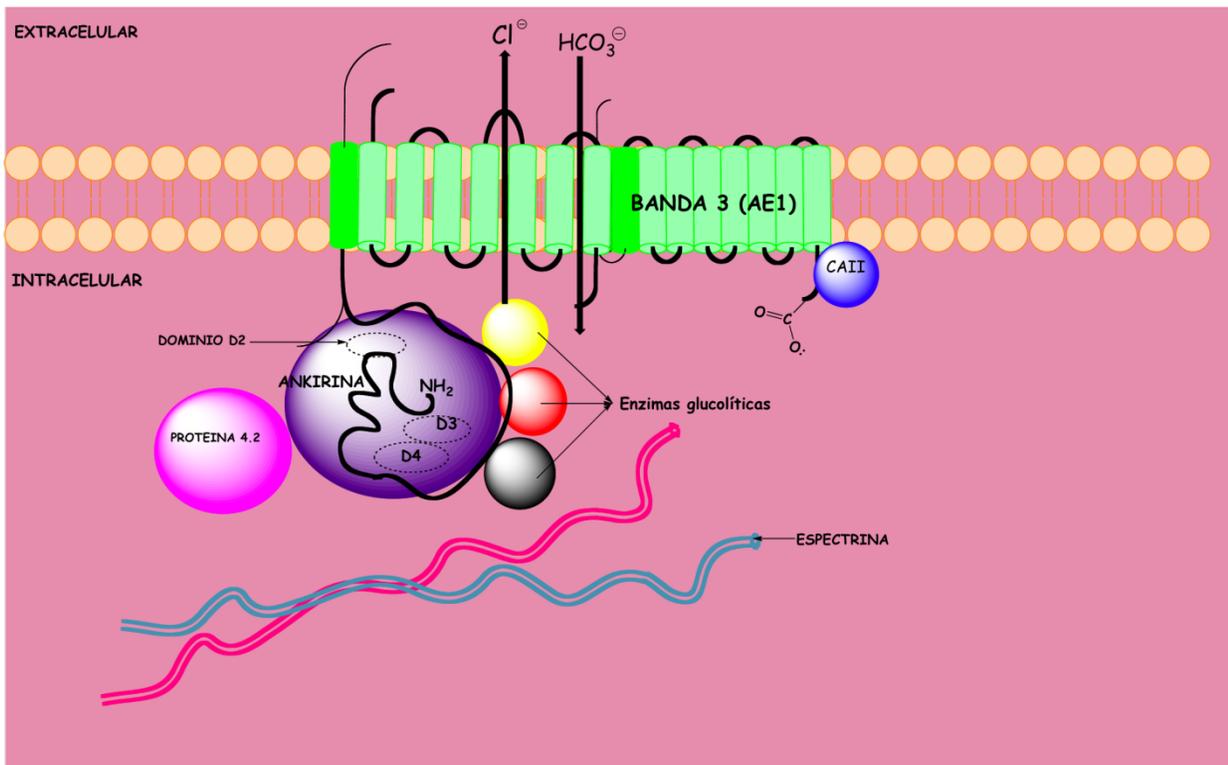


Figura 9. Intercambio aniónico por la banda 3

La función más importante del eritrocito es el transporte de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y el bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), siendo el primero indispensable para la vida de los mamíferos (Bosman and Kay, 1988).

La sangre transporta el oxígeno desde los pulmones hacia los diversos tejidos, donde este gas participa en la respiración aeróbica; que es la reducción del oxígeno por los electrones, con la incorporación concertada de protones al final de la cadena de transporte de electrones para formar agua.

Por otra parte el  $\text{CO}_2$  generado por la degradación de compuestos orgánicos se lleva por la sangre desde los tejidos hacia los pulmones o los bronquios, donde se libera al medio (Hicks, 2006). El oxígeno es transportado disuelto en la sangre o unido a la hemoglobina. Solo alrededor de 1.5% del oxígeno se transporta disuelto en la sangre; el resto unido al grupo amino forma un carbamato y libera protones.

La reacción del  $\text{CO}_2$  con el agua es catalizada por la anhidrasa carbónica; en ella se produce ácido carbónico (Bartosz et al., 1987), el cual a su vez, se disocia en protones y bicarbonato.

En forma de bicarbonato el CO<sub>2</sub> se une a la interfase entre los dímeros αβ de la hemoglobina, y de esta manera se transporta. En ambas reacciones se liberan protones, por lo que el pH de la sangre puede volverse más ácido: con la finalidad de evitarlo, la hemoglobina también puede unirse a los protones y conducirlos hacia los pulmones para excretarlos. Así la hemoglobina funciona como un transportador de oxígeno, bióxido de carbono y protones (Hicks, 2006). (Figura 10)

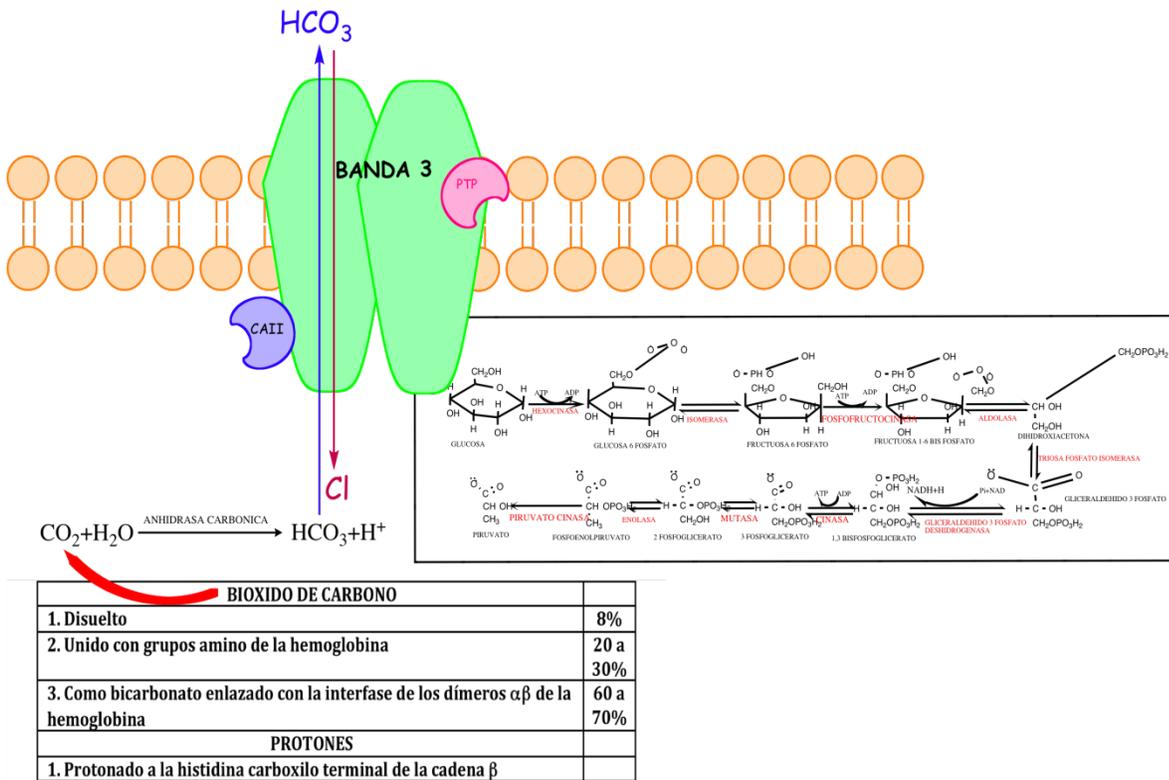


Figura 10. Extrusión del CO<sub>2</sub>

El oxígeno y el bióxido de carbono no compiten por el grupo hemo de la hemoglobina; sin embargo, para que la hemoglobina pueda unirse al CO<sub>2</sub> o a los protones debe liberar primero al oxígeno. La oxigenación de la hemoglobina en los pulmones libera CO<sub>2</sub> puesto que causa que los protones se liberen de la hemoglobina. Estos protones se unen con el bicarbonato para formar ácido carbónico, que por acción de la anhidrasa carbónica origina de nuevo CO<sub>2</sub>, el cual se exhala en consecuencia, su metabolismo, queda limitado a la glucolisis, El ciclo de las pentosas fosfato, el ciclo del 2,3-bisfosfoglicerato, algunas reacciones de oxidorreducción para la detoxificación de sustancias oxidantes y otras pocas reacciones de la ruta de rescate de nucleótidos. Estas rutas y reacciones son justamente las precisas para mantener sus necesidades metabólicas durante su vida. Los eritrocitos

requieren la energía para llevar a cabo el transporte iónico, la síntesis del glutatión, la ruta de rescate de nucleótidos y la conservación de la estructura de la membrana, que son necesarias para mantener un medio interno que proteja la hemoglobina del ataque oxidativo, guarde un rango estrecho de pH y sostenga la concentración óptima de 2,3 DPG necesario para la función de la hemoglobina. Para soportar estas tensiones, el eritrocito utiliza vías alternas para mantener estables los niveles de ATP y de poder reductor necesarios para cumplir sus funciones vitales. Las proteínas banda 3, se encuentran reguladas por la fosfotirosina fosfatasa (PTP).

#### *1.7.4 Actividad de la Fosfotirosina Fosfatasa (FTF)*

Hace 40 años se reconoció, por primera vez, que la fosforilación reversible de proteínas es un proceso dinámico implicado en la regulación de múltiples funciones celulares. De las miles de proteínas que se expresan en una célula típica de mamífero, un tercio contiene un grupo fosfato unido covalentemente. Los tres aminoácidos que pueden ser fosforilados en las proteínas son: Ser, Thr y Tyr. La fosforilación en residuos Ser/Thr es mucho más frecuente que en residuos Tyr. Sin embargo, aunque estos últimos sólo representan el 0,01-0,05% del total de fosfoaminoácidos, regulan procesos cruciales para el funcionamiento de la célula y de cualquier organismo como son el crecimiento, la diferenciación y la transformación celular (Kay MM, et al.,1991). Los niveles de fosforilación en tirosina son el resultado de la acción coordinada y regulada de dos tipos de enzimas: proteínas tirosinas quinasas (PTKs) y proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs).

Inicialmente, la mayoría de los estudios se centraron sobre las PTKs, mientras que las PTPs no despertaron un interés especial en la comunidad científica. Se las consideraba un componente poco sofisticado en las reacciones de fosforilación, incluso se dudaba de su especificidad al pensar que sólo unas pocas tirosinas fosfatasas, relativamente inespecíficas, eran capaces de terminar el trabajo de numerosas tirosinas quinasas. Sin embargo, los resultados de los últimos años han demostrado que las PTPs forman una gran superfamilia de enzimas, sometidas a una compleja regulación, que van a intervenir en el control de múltiples rutas de señalización celular. Además, presentan una elevada especificidad de sustrato, llegando incluso a diferenciar el lugar de fosforilación que será hidrolizado dentro de cada sustrato.

Las PTP clásicas se caracterizan por tener al menos un dominio de 240-250 aminoácidos muy conservados que rodean a la secuencia consenso y que se denomina dominio catalítico o dominio PTP. Esta familia puede subdividirse en 2 subgrupos, dependiendo de la localización celular: las PTPs no receptor o intracelulares y las PTPs transmembrana o similares a un receptor. Las PTP no receptor son enzimas intracelulares que tienen un solo dominio catalítico. En su extremo N-terminal o C-terminal aparecen diferentes dominios estructurales de longitud variable y homólogos a los que aparecen en otras proteínas. Estos segmentos no catalíticos controlan la función de estas PTPs, dirigiéndolas a compartimentos subcelulares específicos o modulando directamente la actividad enzimática. Además, la actividad de la enzima se regula por cambios conformacionales causados por fosforilación en residuos de Ser/Thr o Tyr, o a través de la interacción del dominio catalítico con los propios dominios no catalíticos adquiriendo una conformación inactiva, como ocurre en las SHP-1 y SHP-2. Las PTP transmembrana presentan una estructura similar a la de un receptor típico de membrana: un dominio extracelular variable, un dominio transmembrana y uno o dos dominios catalíticos intracelulares. Los dominios extracelulares pueden interactuar con ligandos que regulan la actividad de los dominios catalíticos. Estos dominios presentan una gran variabilidad estructural, posiblemente reflejo de sus diferentes funciones y ligandos fisiológicos <sup>(Zipser et al 1996)</sup>. En la mayoría de los casos, en estos dominios aparecen secuencias similares a las presentes en proteínas implicadas en procesos de adhesión celular, lo que sugiere que estas PTPs pueden participar activamente en los procesos de interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Las fosfatasas de especificidad dual (DSP) poseen capacidad de desfosforilar residuos de pSer/pThr y pTyr. Al igual que otras fosfatasas, muestran una alta selectividad de sustratos regulando vías de señalización celular importantes como la de MAPK.

La fosforilación de la banda 3 se ha propuesto para regular la glucólisis y el intercambio aniónico, para que se lleve a cabo eficientemente la extrusión del CO<sub>2</sub>. La asociación de la Banda 3 con la fosfotirosina Fosfatasa es de vital importancia para que el eritrocito lleve a cabo exitosamente sus funciones vitales.

#### *1.7.5 Alteraciones Biológicas en los eritrocitos debido al EO*

El organismo necesita oxígeno para que las células puedan ejercer su función biológica correctamente, una mala oxigenación provoca disfunciones en el eritrocito. Diversas

investigaciones han demostrado alteraciones sufridas en los eritrocitos de pacientes con EPOC atribuibles al estrés oxidativo (Tabla 2).

Tabla 2. Alteraciones biológicas en los eritrocitos de pacientes con EPOC debido al estrés oxidativo.

Modificaciones en el eritrocito	Referencias
<p>Las alteraciones en los eritrocitos debido al estrés oxidativo, presentan una disminución en la capacidad de transportar y difundir el O<sub>2</sub> a los tejidos, situación que se encuentra asociado con la reducción de PO<sub>2</sub> (hipoxemia), condición característica en los pacientes con EPOC, lo que conduce a la disfunción muscular.</p>	<p>Decramer M y col. Resp Med, 2005.</p>
<p>Los cambios oxidativos pueden compararse con los que presenta de un eritrocito prematuramente envejecido. Este daño oxidante puede contrarrestarse con la utilización de antioxidantes <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i> en retos experimentales.</p>	<p>Matarrase P, y col. FASEB J, 2005.</p>
<p>En los eritrocitos de pacientes con EPOC, se encuentra disminuida la concentración de glutatión reducido (GSH), y se presenta un aumento en la susceptibilidad endógena al estrés oxidativo.</p> <p>a) Aumenta la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina.</p>	<p>Yehudit Zipser, y col. Biochem J, 1996</p>
<p>Los eritrocitos de pacientes con EPOC presentaron modificaciones morfológicas y funcionales: con una disminución en la expresión en membrana de glicoforina. Estas alteraciones pueden explicar la modificación de la plasticidad del eritrocito que es esencial para</p>	<p>Straface E, y col., Biochem Biophys Res Commun, 2000.</p>

<p>su funcionamiento y forma.</p>	
<p>Un estudio fue realizado en sangre periférica, en donde se compara los cambios oxidativos en los eritrocitos de pacientes con EPOC, y concluyen que los eritrocitos tienen una aplicación potencial, ya que son considerados como bioindicadores, para monitorear la salud humana en la práctica clínica.</p>	<p>Lucantoni y col. Antiox &amp; Redox Signaling, 2006.</p>
<p>En un estudio reportaron claramente que los eritrocitos de pacientes con EPOC, presentaron alteraciones morfológicas y funcionales muy similares cuando los eritrocitos de voluntarios sanos son expuestos in vitro a peroxinitrito, y demostraron que existe una correlación entre las alteraciones de los eritrocitos y las evaluaciones clínicas en los pacientes con EPOC.</p>	<p>Rogowski O, y col. Am J Ther, 2005.</p>

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las partículas contaminantes debido a su muy diversa composición, especialmente metales de transición pueden generar radicales libres mediante la reacción de Fenton y con ello generar un desequilibrio metabólico llamado estrés oxidativo (EO). El EO se encuentra presente en diversas patologías como lo es la EPOC, la cual se caracteriza por una mayor dificultad de aporte de oxígeno al pulmón y a los tejidos, así como por un incremento en el daño oxidativo a nivel pulmonar. En estudios epidemiológicos se ha establecido que existe una relación entre los niveles de contaminación concomitante al aumento en los ingresos hospitalarios de pacientes con enfermedades pulmonares, se considera que la población de enfermos con EPOC, pueden presentar cierta susceptibilidad a contaminantes atmosféricos, en especial al material particulado con un diámetro de 2.5, ya que estas partículas se encuentran suspendidas en el aire y son fácilmente acezadas a las vías respiratorias, este material particulado una vez que penetra en las vías respiratorias bajas, es posible que afecte a los eritrocitos, dificultando el transporte y la difusión del oxígeno, situación que es de vital importancia en la EPOC, debido a la hipoxia tisular que presentan estos pacientes. La trascendencia del estudio radica en evaluar por un lado los marcadores de daño oxidativo en la membrana de los eritrocitos ante retos oxidantes, en una célula que ya se encuentra dañada en su morfología y funcionalidad que están directamente ligadas al transporte y aporte de oxígeno a los tejidos. El daño adicional ocasionado por el efecto oxidante de las PM permitirá considerar la razón de la susceptibilidad de poblaciones vulnerables por padecimiento pulmonar a la contaminación atmosférica.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ocupa los primeros lugares de morbi-mortalidad en todo el mundo. Su prevalencia mundial en personas mayores de 40 años de edad es del más del 10%. Con frecuencia, la EPOC es diagnosticada equivocadamente como asma o no es diagnosticada en sus etapas leves y moderadas por ser una enfermedad que generalmente se manifiesta después de los 40 años. Los síntomas son atribuidos inicialmente a la edad, por lo que los pacientes no se atienden hasta que los síntomas son severos. El diagnóstico de la EPOC se basa en una evaluación de a) los factores de riesgo, como el hábito de fumar y la exposición a la contaminación ambiental. Es bien conocido que la exposición a la contaminación atmosférica tanto de origen industrial como la proveniente del tráfico vehicular pueden afectar a pacientes con enfermedades pulmonares, estos agentes oxidantes nos llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno que en exceso dan como resultado efectos perjudiciales sobre las células. Existe evidencia en aumento, de que el estrés oxidativo se encuentra asociado de manera importante en la EPOC, y que puede tener un papel fisiopatológico fundamental en la enfermedad, al amplificar la respuesta inflamatoria. También se sabe que la contaminación ambiental incrementa el número de hospitalizaciones. Sin embargo, la relación entre contaminación ambiental y las enfermedades respiratorias no ha sido suficientemente investigada, en particular en lo que se refiere a la exposición crónica a los contaminantes ambientales más habituales como lo son las PM<sub>2.5</sub>, porque estas son capaces de depositarse en vías respiratorias bajas, lo que produciría que se pongan en contacto con los eritrocitos ocasionándoles un daño adicional al que ya presenten los eritrocitos debido al estrés oxidativo presente en la EPOC, es por eso que en este trabajo se plantea la posibilidad de conocer el mecanismo bioquímico por el cual los pacientes con EPOC, representan una población susceptible a la contaminación atmosférica, y con la información obtenida se

podría mejorar la terapéutica de estos pacientes. En publicaciones recientes se ha llamado la atención en la utilidad del uso de las terapias antioxidantes en el tratamiento de la EPOC, con el fin de bloquear o revertir el desequilibrio antioxidante presente en la enfermedad, aunque sin evidencia científica suficiente. La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) afecta a millones de personas en todo el mundo. Aunque es incurable, el tratamiento médico adecuado y el uso correcto de antioxidantes podrían ayudar a personas con EPOC a disfrutar una mejor calidad de vida.

#### **4. HIPOTESIS**

Los biomarcadores de daño oxidativo en los eritrocitos de pacientes con EPOC GOLD I, II, III y IV se presentan elevados en comparación a un grupo control, esta condición se verá incrementada por la exposición *in vitro* a PM (partículas contaminantes de la atmósfera) provocando una mayor alteración en los mecanismos antioxidantes conduciendo a daño membranal y a la disminución en la función del eritrocito.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el daño oxidativo a membranas de eritrocitos de individuos sanos y de pacientes con EPOC (GOLD I, II, III y IV) antes y después de exponerlas a un inductor de daño (PM), utilizando biomarcadores de daño estructural.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar en plasma de individuos sanos y de pacientes con EPOC (GOLD I, II, III, y IV) la presencia de biomarcadores de estrés oxidante (LPH, MDA, carbonilación de proteínas, actividad enzimática de Paraoxonasa).
- Evaluar algunas modificaciones membranales utilizando biomarcadores de daño a lípidos (dienos conjugados, hidroperóxidos, y Malondialdehído), daño a proteínas (carbonilación de proteínas), así como la actividad de la enzima Fosfotirosina fosfatasa (asociada a la banda 3) en los eritrocitos de individuos sanos y de pacientes con EPOC I, II y III y IV antes y después de ser expuestos al estímulo.
- Evaluar en el citosol de los eritrocitos de pacientes con EPOC I, II y III y IV y de voluntarios sanos, la concentración SH no proteicos, la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa, antes y después de ser expuestos al estímulo.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

El proyecto de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética con el número de registro B10-08.

### **6.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

En este estudio se utilizarán muestras de sangre total aproximadamente 5 mL, por punción venosa, que podrá ser obtenida cuando los pacientes se realicen estudios de laboratorio como parte del seguimiento de su padecimiento. Por ningún motivo se tomarán muestras de sangre, fuera de la indicación médica.

Por lo anterior este estudio es considerado por el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud como de riesgo mínimo.

Se informará al paciente que una parte de la sangre tomada en el laboratorio clínico se utilizará para otras evaluaciones con fines de investigación por lo que se solicitará la autorización del paciente o de algún familiar por medio de una carta de consentimiento informado.

## 6.2 TIPO DE ESTUDIO

- ➡ Experimental
- ➡ Transversal
- ➡ Prospectivo

Variable Independiente

Material Particulado

Variable Dependiente

Cuantificación de marcadores de estrés oxidante.

## 6.3 TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de la muestra fue calculado mediante la fórmula de diferencia de medias, en la cual se utilizó como parámetro de referencia a la varianza de los grupos carbonilo expresados como nmol de dinitrofenilhidrazonas/mg de proteína de 67 voluntarios sanos (Torres-Ramos, 2006)

$$N = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (2)(S_p)^2}{(d)^2}$$

N= No. de pacientes

$Z_{\alpha}$ = 95%

$Z_{\beta}$ = 80%

$S_p$ = 0.0273 nmol Dinitrofenilhidrazonas/mg proteína.

d = 0.053. nmol Dinitrofenilhidrazonas/mg proteína

$$N = \frac{(1.96 + 0.84)^2 (2)(0.0273)^2}{(0.053)^2} = 4.2$$

Fueron incluidos 43 pacientes con EPOC distribuidos en cuatro grupos de acuerdo a la clasificación en GOLD I (n=7), GOLD II (n=19), GOLD III (n=10) y GOLD IV (n=7) y 11 voluntarios sanos como grupo control.

## 6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

### 6.4.1 Criterios de inclusión para pacientes con EPOC

Pacientes de sexo indistinto, con un rango de edad de 60 a 70 años, con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica que cumplan los criterios internacionales para ser considerados GOLD I, II, III, y IV que radiquen en la zona metropolitana de la Ciudad de México, y que firmen el consentimiento informado.

### 6.4.2 Criterios de eliminación para pacientes con EPOC.

La presencia de cualquier patología activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis) cáncer.

### 6.4.3 Criterios de inclusión para el grupo control

Voluntarios del género masculino o femenino, con un rango de edad de 60 a 70 años. Que las pruebas de laboratorio corroboren su buen estado de salud. Que hayan firmado el consentimiento informado.

### 6.4.4 Criterios de eliminación para el grupo control.

Que sean fumadores activos y/o pasivos, que presenten cualquier patología activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis) cáncer.

#### 6.4.5. Pruebas clínicas

##### 6.4.5.1 Exámenes de laboratorio.

Se incluyo adicionalmente a las pruebas solicitadas (Biometría hemática, Química Sanguínea) en cada consulta, el perfil de lípidos. Para el grupo control fueron realizados los mismos estudios solicitados para los pacientes.

##### 6.4.5.2 Pruebas de Función respiratoria.

La espirometría es la técnica que mide los flujos y volúmenes respiratorios útiles para el diagnóstico y seguimiento de patologías respiratorias como es el caso de la EPOC.

La espirometría consiste en solicitar al paciente, que tras una inspiración máxima, realice una espiración de todo el aire, en el menor tiempo posible. Los valores de flujos y volúmenes que se obtienen mediante esta prueba son:

1. Capacidad vital forzada (FVC): Volumen total que expulsa el paciente desde la inspiración máxima hasta la espiración máxima. Su valor normal es mayor del 80% del valor teórico.
2. Volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada (FEV1): Es el volumen que se expulsa en el primer segundo de una espiración forzada. Su valor normal es mayor del 80% del valor teórico.
3. Relación FEV1/FVC: Indica el porcentaje del volumen total espirado que lo hace en el primer segundo. Su valor normal es mayor del 70-75%.

Otro de los parámetros importantes a evaluar en los pacientes con EPOC fue el Índice tabáquico .En donde se tomo en consideración el número de cigarrillos fumados al día y el tiempo durante el que se había fumado, el índice tabáquico, se calcula con el número de años fumando multiplicado por el número de cigarrillos al día entre 20, y se reporta como paquetes al año, mismo que representa un factor de riesgo cuando es de 10 o más, al menos para cáncer broncogénico.

Las partículas contaminantes de la atmósfera, fueron obtenidas de CENICA (Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental perteneciente al Instituto Nacional de Ecología "INE", Instituto Nacional de Ecología).

## 6.5 TOMA DE LA MUESTRA

La toma de muestra de sangre se realizó por el personal de enfermería de la clínica de tabaquismo del INER, fueron tomados 2 vacutainers (BD Vacutainer: Sodium Heparin 143 USP Units y K<sub>2</sub> EDTA 7.2 mg). El vacutainer con Heparina se requiere para cuantificar la enzima paraoxonasa, ya que esta es dependiente de calcio.

## 6.6 SEPARACIÓN DEL PAQUETE DE ERITROCITOS

Las muestras de sangre fueron separadas mediante un gradiente de densidad Polimorprep, donde fueron depositados 5 mL del gradiente en un tubo falcón, posteriormente con una pipeta pasteur fue depositada por las paredes la sangre completa, los tubos fueron centrifugados 2400rpm durante 30 minutos de 20-25°C. Finalmente fueron separadas la fracción de plasma, leucocitos y el paquete de eritrocitos.

## 6.7 LAVADO DE ERITROCITOS

Fueron lavados 2 veces el paquete de eritrocitos con un volumen igual de solución salina, que contenía 1mg/mL de glucosa. Posteriormente fueron centrifugados 5 minutos a 1000g. Se realizó una tercer lavada, con una solución Krebs Ringer pH 7.4, conteniendo 1mg/mL de glucosa para posteriormente ser centrifugada 5 minutos a 1000g. El paquete de eritrocitos fue resuspendido en un volumen igual de la solución anterior, aproximadamente quedan 6mL. La suspensión de eritrocitos es separada en tres fracciones de 2.0 mL, cada una fue sometida a diferentes tratamientos.

## 6.8 ESTANDARIZACIÓN EN LAS CONCENTRACIONES DE LOS INDUCTORES DE DAÑO OXIDATIVO (REACCIÓN DE FENTON Y MATERIAL PARTICULADO)

Para estandarizar las concentraciones de la reacción de Fenton y del material particulado, se realizaron pruebas de viabilidad (conteo de eritrocitos, determinación de hemólisis), para asegurar que el efecto que se pudiera encontrar no se debiera a que los tratamientos fueran tan agresivos, que ocasionaran un alto porcentaje de muerte en los eritrocitos.

### 6.8.1 *Conteo de los eritrocitos*

El conteo de los eritrocitos se llevo a cabo de la siguiente manera:

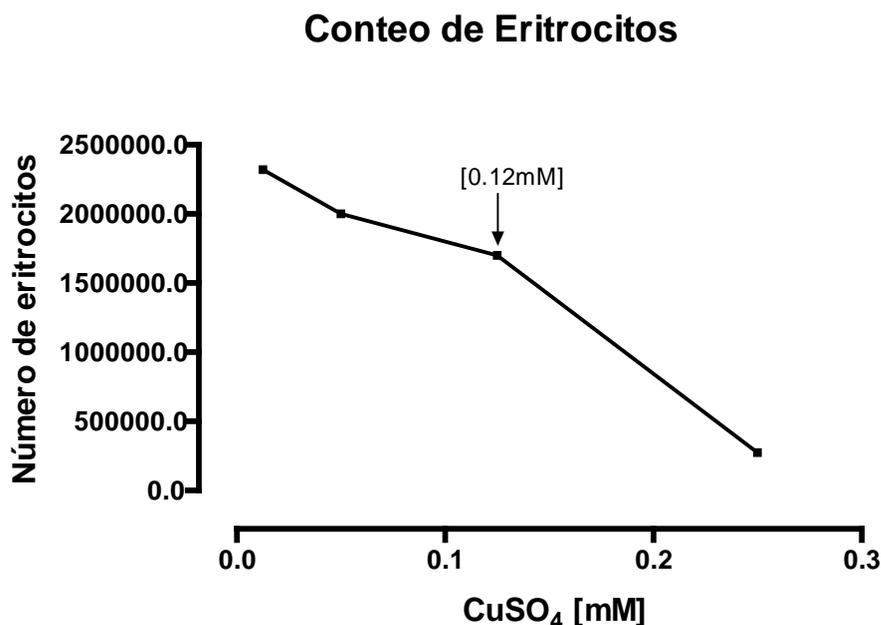
Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del paquete de eritrocitos en un tubo que contenía 4mL de la solución de Hayem (solución que nos permite observar claramente a los eritrocitos) (1:200). Se deja reposar 5 minutos y se carga la cámara de Neubauer.

Con ayuda de un microscopio a un objetivo de 40X se realiza el conteo, para calcular el número de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$ , se cuenta sobre el cuadro grande central de la cámara solo en 5 cuadros pequeños, uno central y cuatro angulares (80 cuadros en total)

En el recuento se incluyen las células que cubren o tocan por dentro o por fuera las líneas limitantes superior izquierda y no se consideran los correspondientes a los límites inferiores y derecho.

Para obtener el resultado por número de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$ , se utilizó la siguiente fórmula:

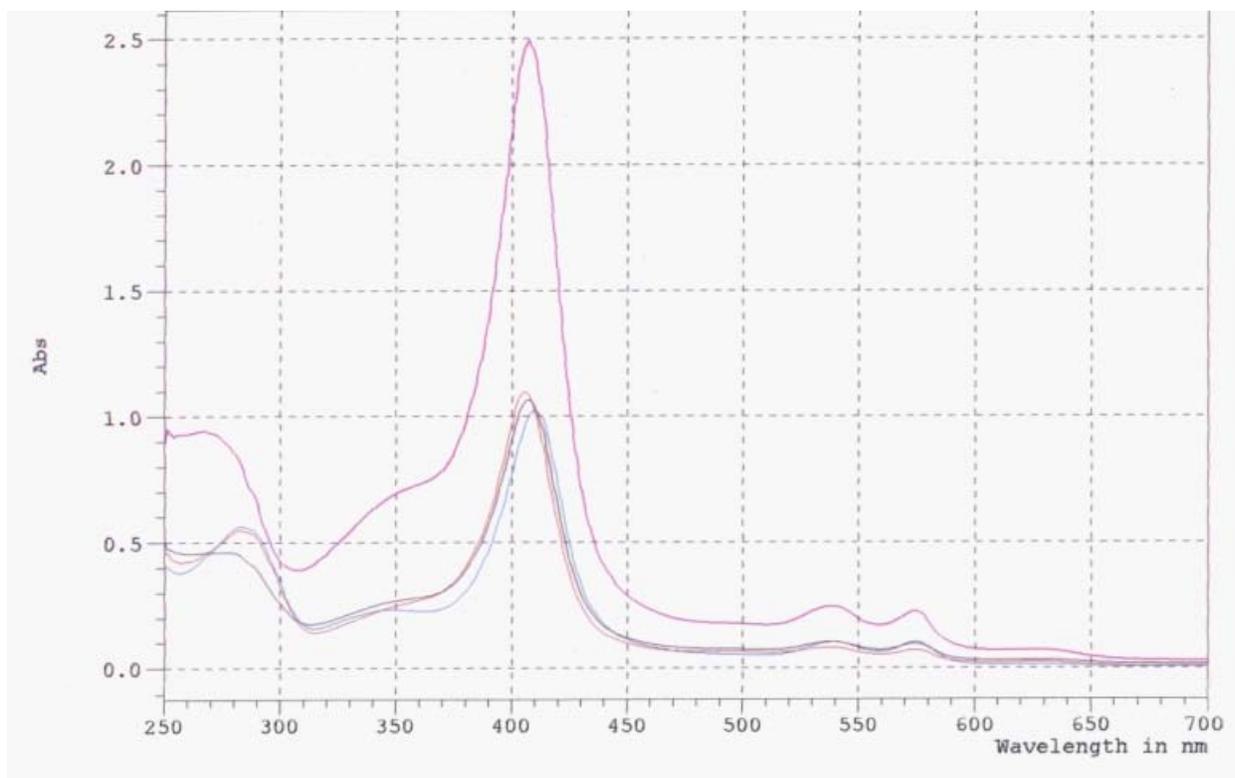
$$\text{Número de Eritrocitos}/\text{mm}^3 = \frac{\text{hematíes contadas en 5 cuadros pequeños}}{\text{altura} \times \text{dilución} \times \text{área}}$$



Gráfica 1. Conteo de los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$

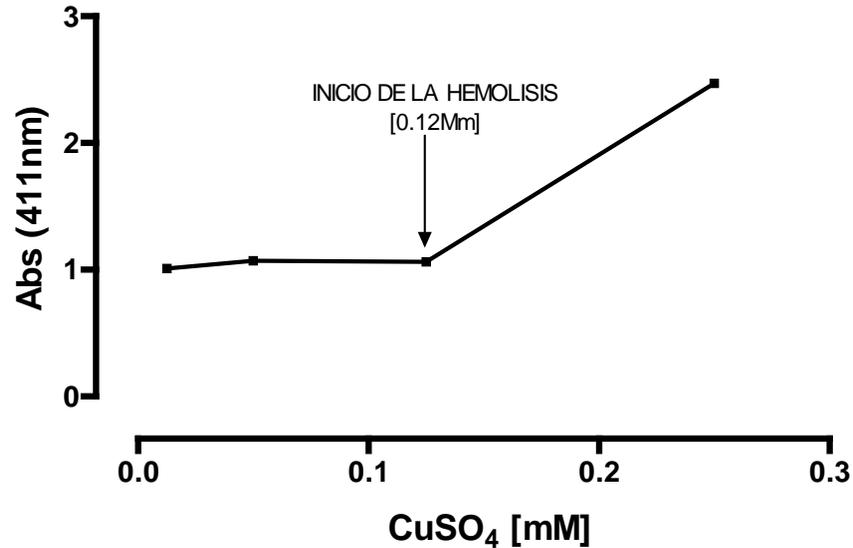
### 6.8.2 Determinación de la hemólisis en los eritrocitos.

Después de que se llevan a cabo los retos con la reacción de Fenton y el material particulado, los tubos se centrifugaron a 100g durante 5 minutos, para posteriormente obtener un espectro de 300-700 nm del sobrenadante y así obtener la cantidad de Hemoglobina, que su pico máximo se encuentra en los 412 nm.



Gráfica 2. Espectro de absorción de 300-700 nm, para la determinación de la hemólisis en los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$

## HEMOGLOBINA



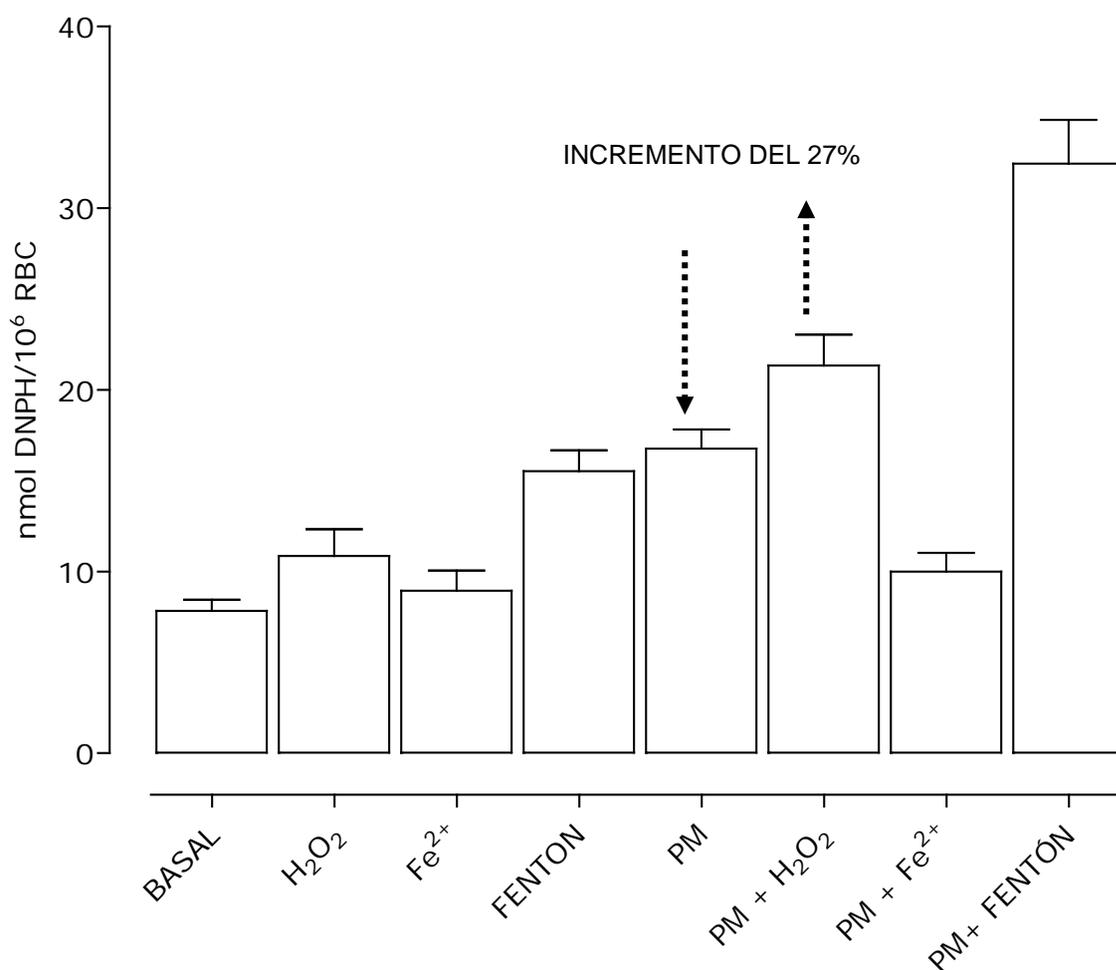
Gráfica 3. Determinación de la hemólisis en los eritrocitos, cuando son sometidos a la reacción de Fenton, variando las concentraciones de CuSO<sub>4</sub>

De acuerdo a las pruebas de viabilidad se obtuvieron las siguientes condiciones para cada uno de los retos: la reacción de Fenton [10µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+0.025Mm de CUSO<sub>4</sub>] y del material particulado [0.05 mg/mL].

Ya que se obtuvieron las concentraciones adecuadas para cada reto. Fue imperativo demostrar que las partículas contaminantes de acuerdo a la composición química que presentaban, podrían favorecer la reacción de Fenton, ya que en su composición química presentan hierro, para comprobar esta suposición se realizaron algunas pruebas que consistieron en someter a los eritrocitos a:

1. Los componentes de la reacción de Fenton por separado
2. Al Fenton completo
3. Al material particulado
4. El material particulado, enriquecido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
5. El material particulado, enriquecido con CuSO<sub>4</sub>
6. Al Fenton completo, enriquecido con material particulado

### Carbonilación de Proteínas



Gráfica 4.

Ensayos para determinar si influye la composición química de las partículas para llevar a cabo la reacción de Fenton

Como se observa en la gráfica 1, podemos apreciar que las membranas de eritrocitos presentan una concentración de DNPH, similar cuando los eritrocitos son sometidos a material particulado así como a la reacción de Fenton ( $16.77 \pm 3.35$ ,  $15.53 \pm 3.042$  nmol DNPH/10<sup>6</sup> eritrocitos respectivamente), cuando se someten a los eritrocitos a partículas contaminantes enriquecidas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podemos observar que hay un incremento del 27% en la concentración de DNPH, a comparación de los eritrocitos expuestos únicamente a el material particulado. Este resultado nos llevaría a suponer que por el contenido de Hierro que tienen las partículas, al reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lleva a cabo la reacción de Fenton, la cual se podría ver reflejada por el aumento en la carbonilación.

## 6.9 TRATAMIENTO DE LOS ERITROCITOS ANTE LOS INDUCTORES DE DAÑO OXIDATIVO.

La suspensión de eritrocitos es separada en tres fracciones de 2.0 mL, cada una fue sometida a diferentes tratamientos.

La primera parte fue utilizada como parámetro basal, es decir esta no recibió ningún tratamiento, la segunda parte fue sometida a la reacción de Fenton [10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+0.025Mm de CUSO<sub>4</sub>] transcurridos 5 minutos de incubación la reacción fue detenida con Citrato 0.025mM, a la ultima parte le fueron adicionados [0.05 mg/mL] de PM

## 6.10 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE ERITROCITO.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación para cada tratamiento, fueron depositados 500 $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos (SE) en un eppendorf adicionando 1000  $\mu$ L de la S5P8 (solución lítica, solución 5mM pH 8.0), enriquecida con Protease Inhibitor Cocktail 40 $\mu$ L/mL de S5P8 + phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1 $\mu$ L/mL de S5P8. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000rpm durante 30' a 4°C. Fue recolectado el primer **sobrenadante (SN)**, para proseguir lavando las membranas de eritrocito con la S5P8 + PMSF (1 $\mu$ L/mL), hasta que se obtuvieron libres de hemoglobina (13,000 rpm, 15 min) y finalmente fueron resuspendidas en un volumen igual de Krebs Ringer pH 7.4. La solución lítica y las muestras se mantuvieron en hielo.

Una vez obtenido el plasma, el citosol y las membranas de eritrocitos fueron determinados los siguientes parámetros de estrés oxidativo, así como la actividad de algunas enzimas.

Plasma {  
 Lipohidróperoxidos  
 MDA  
 Carbonilación de proteínas  
 Actividad enzimática de Paraoxonasa  
 Proteínas Totales  
 Peso Seco

Citosol del Eritrocito {  
 SH no proteicos  
 Glucosa-6-fosafato-deshidrógenasa  
 Proteínas Totales  
 Peso Seco

Membranas de eritrocito {  
 Dienes conjugados  
 Lipohidroperoxidos  
 MDA  
 Carbonilación de proteínas Fosfotirosina fosfatasa  
 Proteínas Totales  
 Peso Seco

## 6.11 BIOMARCADORES DE DAÑO A LIPIDOS

### 6.11.1 Determinación de Dienes conjugados

Los dienos conjugados son el primer producto de lipoperoxidación, provocados por el ataque del radical libre hidroxilo hacia los grupos metilo, de un ácido graso poliinsaturado, en el cual se lleva acabo un rearrreglo secuencial de dobles enlaces. Los dienos conjugados fueron determinados utilizando 30µL de membranas de eritrocitos, los cuales son sometidos a una extracción cloroformo-metanol 2:1, Posteriormente se centrifugaron a 4000rpm durante 10 minutos a 20°C, fueron recolectados 500 µL de la fase cloroformica, con cuidado de no tocar la capa amarilla, posteriormente se evaporo a sequedad, finalmente la pastilla fue resuspendida en ciclohexano concentrado, protegiéndolos de la luz. Se determinó la absorbancia en un Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a 234nm utilizando para los cálculos un coeficiente de extinción molar de  $\epsilon = 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Richard, 1984).

### 6.11.2 Determinación de Hidroperóxidos

Los hidroperóxidos lipídicos son moléculas relativamente estables, pero algunos compuestos de hierro reducido catalizan su descomposición para dar origen a radicales alcóxilo; también es posible la reacción de los radicales peróxilo con los compuestos de hierro.

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

Para la cuantificación de lipohidroperóxidos en membranas de eritrocito fue utilizado un método iodométrico el cual consistió en adicionar a 30µL de membranas de eritrocitos, un reactivo comercial de Merck, cat. nom 14106I CHOLPAD (es utilizado para medir esteres de colesterol) y yoduro de potasio 1M. Esta mezcla fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. La concentración de lipohidroperóxidos fue determinada espectrofotométricamente en un Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a 360nm, Fue utilizado terbutil-hidroperoxido como estándar. Para la determinación de lipohidroperóxidos en plasma fueron utilizados 20µL y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado <sup>(E)</sup> Saadani et al., 1989).

### 6.11.3 Determinación del Malondialdehído

El MDA es uno de los productos finales de la lipoperoxidación. Para cuantificar el MDA, se tomaron 30µL de membrana de eritrocitos a los cuales se les adiciono el MPI (1-METHYL-2-PHENYLINDOLE) [15mM], HCl al 37%. La reacción fue incubada 40' a 45°C. Transcurrido el tiempo de incubación fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos Se determinó la absorbancia en un Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a 584 nm, fue utilizado el Tetraetoxipropano (TEP) como solución estándar. Para la determinación de MDA en plasma fueron utilizados 50µL y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado.

Para cada caso los biomarcadores de daño a lípidos fueron corregidos por mg de peso seco (materia orgánica total).

## 6.12 BIOMARCADOR DE DAÑO A PROTEÍNAS

### 6.12.1 Carbonilación de proteínas

Uno de los biomarcadores más utilizados de daño a proteína es la cuantificación de grupos carbonilos <sup>(Dalle-Donne et al, 2003)</sup>. La oxidación de proteínas es definida como la modificación

covalente de las proteínas inducida directamente por ERO o indirectamente por reacción de bioproductos del estrés oxidativo

Se mezclaron 100µl de fantasmas con 500 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM en HCL 2.5 M. Las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen a las proteínas son sensibles al estrés oxidativo. La lisina, prolina y arginina, se oxidan de forma directa por los radicales libres (HO<sup>•</sup>), dando lugar a grupos carbonilo. Las proteínas dañadas por las ERO no deben ser consideradas como productos finales, ya que estas son capaces de dañar otras biomoléculas (Ostad 2002). Las proteínas además de verse afectadas por los radicales libres, también resultan sensibles al reaccionar con productos de lipoperoxidación tales como el MDA, 4-hidroxinonenal (4-HNE) y la acroleína entre otros. Estos productos finales pueden reaccionar con los grupos amino libres y grupos sulfidrilos de las proteínas y formar aductos (unión del grupo aldehído de los productos de lipoperoxidación y el grupo amino libre o sulfidrilo de las proteínas), la cual es otra forma de alterar una proteína por estrés oxidativo (Moncada 2003). La formación de aductos inducen disfunciones en las proteínas y alteran la respuesta celular (Zarcovic,2003, Peterson and Doom, 2004)

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente evitando la incidencia de la luz (fueron agitadas cada 15 minutos durante 60 minutos) y precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm para recolectar la proteína precipitada. La pastilla fue lavada nuevamente con 500µl de TCA al 10%. Finalmente el precipitado se disolvió en 500µl de Guanidina 6M en fosfato de potasio 20 mM, e incubados por 10 minutos a 37°C. Finalmente se analizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 370 nm (Dalle-Donne, 2003).

El coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina es  $\epsilon = 22,000/M^{-1} \text{ cm}^{-1}$   $\epsilon = 22,000/10^6 \text{ nmol/ml}$ , el cual fue utilizado para calcular la concentración de carbonilos, expresados en nmol de dinitrofenilhidrazinas/mg de proteína cuantificadas por el método de Lowry. Para la determinación de carbonización de proteínas en plasma fueron utilizados 50µL y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado.

### 6.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFOTIROSINA FOSFATASA.

El funcionamiento de la proteína Banda 3 se ve afectada por la fosforilación y desfosforilación de la Fosfotirosina Fosfatasa, ya que estas se encuentran asociadas.

La actividad de PTP fue determinada utilizando como sustrato al p-nitrofenil fosfato (p-NPP)<sup>(Yehudit Zipser and Nechama S, 1996)</sup>. Las membranas de eritrocito son suspendidas en 15mM del sustrato e incubadas 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se detiene la reacción con NaOH 5M, las muestras son centrifugadas a 9000g durante 5 minutos. La liberación de p-nitrofenol fue medido espectrofotometricamente a 410 nm. La actividad específica fue calculada mediante el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol, que es de  $18053 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a pH 8.5, y los resultados fueron corregidos por mg de proteína (nmol p-nitrofenol/min/mg proteína), obtenidas por el método de Lowry.

#### 6.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la primera enzima de la vía de las pentosas fosfato y la principal fuente intracelular de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), compuesto comprometido en la defensa antioxidante de los eritrocitos.

La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) se determino mediante el método de John D, cuantificando la reducción del NADP a 340 nm. La reacción contenía 0.5 ml de buffer Tris-HCl 0.05 mol/L a pH 8.8; 0.4 mL de cloruro de magnesio 0.1 mol/L; 0.1 mL de NADP+ 5.9 mmol/L; 0.1 mL de citosol y 1.8 mL de agua destilada. La reacción fue iniciada con 0.1 ml de Glucosa-6-Fosfato 36.3 mmol/L y se midió el cambio de absorbancia a 340 nm durante 2 minutos.

#### 6.15 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PARAOXONASA

La paraoxonasa es una enzima que interrumpe el proceso de lipoperoxidación. Para determinar la actividad de PON-1 en plasma se utilizó el dietil-p-nitrofenolfosfato (paraoxón), como sustrato artificial, este sustrato es hidrolizado por la enzima para formar dos compuestos, el p-nitrofenol y el dietil fosfato

Fueron incubados 25µl de plasma con 5µl de eserina 4mM en H<sub>2</sub>O, después de 10 minutos de esta mezcla se toman 20µl y se le adicionan 480µl de amortiguador Tris Pre-Set 90 mM pH 8.5 conteniendo paraoxón 2.5mM, CaCl<sub>2</sub> 1.9 mM y NaCl 3.6 mM. La formación de p-nitrofenol fue determinada a una longitud de onda de 405 nm a 25°C. tomando lectura a cada minuto, durante 5 minutos. La actividad específica fue calculada mediante el coeficiente de extinción molar del paranitrofenol, que es de  $18053 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a pH 8.5, y los resultados

fueron corregidos por mg de proteína (nmol pnitrofenol/min/mg proteína), obtenidas por el método de Lowry.

#### 6.16 VALORACIÓN ESTADÍSTICA

Los datos fueron analizados mediante diferentes pruebas estadísticas, prueba de t student para muestras independientes, correlación de Spearman. Mediante el programa prisma 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) los datos son presentados como la media  $\pm$  DE se considera una significancia del 95%.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

En la tabla 3, se muestran los datos demográficos y de función pulmonar de la población de estudio, los pacientes están clasificados de acuerdo a la GOLD (I, II, III, y IV). Se puede apreciar que el único parámetro donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas fueron las pruebas de función respiratoria, los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA y una prueba post hoc de Bonferroni.

Tabla 3 Características Demográficas y de Función Pulmonar

	CONTROL n=11	GOLD I n=7	GOLD II n=19	GOLD III n=10	GOLD IV n=7	SE
Edad (años)	61.00±8.8	65.00±5	66.90±6	68.85±9	67.20±6	NS
Genero F/M	10/1	1/6	8/11	4/6	0/7	NS
IT Paquete/año	-----	39±18	42±18	47±16	±45±15	NS
IMC	27.6±3	26.17±4	27.24±5	25.35±5	27.02±3	NS
FEV <sub>1</sub> p(%)	106±21.88	87.71±20	69.40±4	39.75±6	18.40±6	<0.0001
FVC p(%)	104± 21.07	111.43±2	96.30±14	67.42±19	55.25±15	<0.0001
FEV <sub>1</sub> /FVC	79.0±4	59.29±8	56.71±7	46.07±12	26.48±7	<0.0001

**IMC= índice de masa corporal; IT= Índice tabáquico; Media ± DE=desviación estándar; FEV<sub>1</sub>=volumen expirado forzado; FVC=capacidad vital forzada; SE= significancia estadística**

## 7.2 BIOMETRÍA HEMÁTICA

En la tabla 4, se muestran los resultados de la biometría hemática para la población de estudio, se puede observar que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los parámetros a evaluar.

Tabla 4. Biometría hemática

	<i>CONTROL</i>	<i>GOLD I</i>	<i>GOLD II</i>	<i>GOLD III</i>	<i>GOLD IV</i>	SE
Leucocitos (4-10 x 10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	6.74±2.97	6.41±1.94	6.55±0.98	6.76±1.29	7.9±1.16	NS
Neutrofilos (1-4 x 10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	3.78±2.39	3.6±1.14	3.84±1.37	3.45±0.62	4.82±0.96	NS
BI (0-0.75mg/dL)	0.399±0.173	0.371±0.121	0.435±0.24	0.503±0.121	0.418±0.27	NS
Glucosa (55-115 mg/dL)	97.18±11.26	95.75±6.42	94.45±6.61	102.7±11.93	97.86±7.80	NS
Hemoglobina (11.5-17 g/dL)	14.45±0.93	14.90±0.99	15.84±1.09	15.49±2.02	15.6±3.10	NS
Eritrocitos (4.5-5.2 X10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	4.78±0.56	4.93±0.46	5.07±0.52	4.97±0.62	4.98±0.85	NS
<b>Media ± desviación estándar</b>						
<b>SE= Significancia Estadística, BI= bilirrubina indirecta</b>						

## 7.3 PERFIL DE LÍPIDOS

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos del perfil de lípidos, para la población de estudio, se puede observar que hubo una disminución en la concentración de triacilgliceroles entre el GOLD I y el GOLD IV (176.12 ± 95.66, 72 ± 35.54 respectivamente).

	<i>CONTROL</i>	<i>GOLD I</i>	<i>GOLD II</i>	<i>GOLD III</i>	<i>GOLD IV</i>	SE
TAG (50-200mg/dL)	155.4±62.03	176.12±95.66	154.26±74.08	136.77±51.85	72±35.54	*I vs IV
CT (140-200mg/dL)	208.54±26.95	191.58±28.14	214.83±45.97	206.11±59.68	212.14±28.74	NS
Fosfolípidos (80-250 mg/dL)	226.66±12.39	213.57±23.52	243.71±46.14	217.05±46.14	212.6±25.17	NS
HDL (35-65 mg/dL)	53.88±14.64	46.42±17.07	53.63±17.82	58±15.24	60.36±7.34	NS
LDL (0-150 mg/dL)	131.82±26.18	113.62±20.79	134.52±40.42	127.1±47.53	126.4±23	NS
PCR (0-80 mg/dL)	0.483±0.44	0.587±0.674	0.466±0.392	0.487±0.335	0.634±.4069	NS
APO-A (107-214 mg/dL)	154.45±26.27	149.27±35.83	148.10±28.14	151.73±34.5	150.2±22.94	NS
APO-B (51-171 mg/dL)	104.50±34.89	107.67±21.95	111.6±34.172	101.47±28.78	97.52±21.44	NS
No-HDL-C (<160 mg/dL)	154.67±31.61	159.98±28.13	161.20±46.48	133.3±68.63	151.78±31.06	NS

Tabla  
5. Perfil  
de  
Lípidos

**\*La diferencia estadística  $p < 0.001$  se encuentra entre el GOLD I y GOLD IV**  
**SE= Significancia estadística, TAG= triacilgliceroles, CT= colesterol total, PCR= proteína C-reactiva MEDIA±DE**

#### 7.4 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo serán presentados en **dos etapas**:

La primera etapa representa las concentraciones basales de los diferentes biomarcadores, así como el comportamiento de estos, durante la progresión de la EPOC (GOLD I, GOLD II, GOLD III y GOLD IV) en plasma y en membranas de eritrocitos.

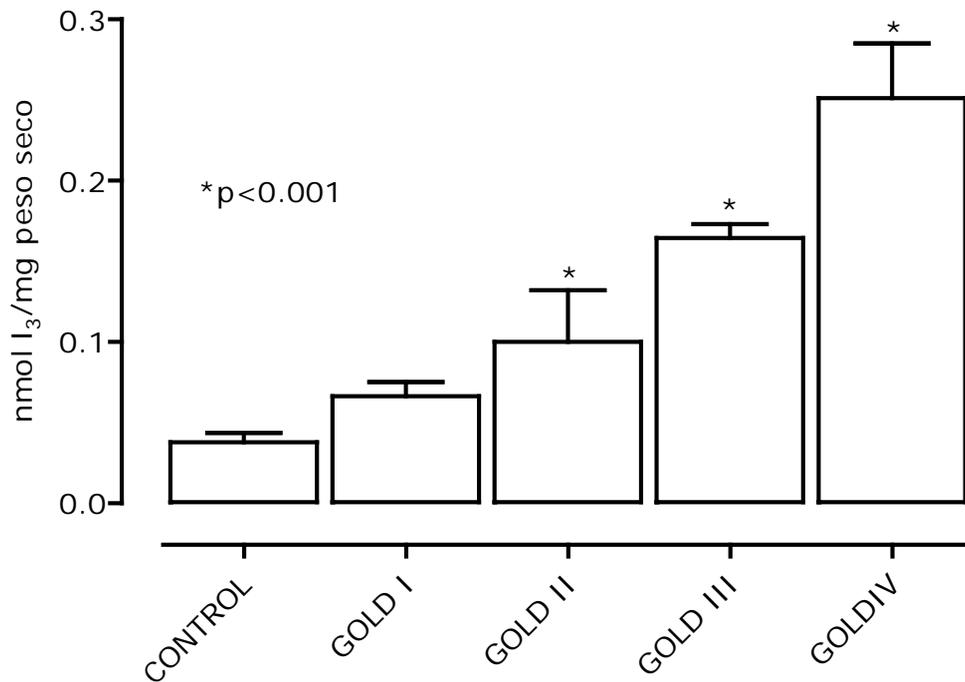
La segunda etapa, corresponde al comportamiento de los eritrocitos de pacientes con EPOC, cuando son expuestos a material particulado, este daño fue evaluado mediante la cuantificación de biomarcadores de estrés oxidativo en membranas de eritrocitos, así como la cuantificación en citosol de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) y de grupos sulfidrilos SH no- proteicos. En esta etapa los datos son presentados de manera distinta, ya que al analizar los resultados de los diferentes estadios de la EPOC I, II, III, y IV, no se encontraron diferencias estadísticas evidentes, ya que el GOLD I y II presentaron comportamientos similares al igual que el GOLD III y IV, por lo que se determino con asesoría del grupo de Neumólogos del INER, agrupar GOLD I con el GOLD II, y al GOLD III con el GOLD IV, y clasificarlos como EPOC moderada y EPOC severa respectivamente. De esta manera se logro organizar de una manera eficiente y lógica los resultados, con la finalidad de obtener información que nos ayudara a comprender y explicar el efecto de las partículas sobre los eritrocitos en la población de estudio.

### **7.4.1 PRIMERA ETAPA**

#### **7.4.1.1 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO DETERMINADOS EN PLASMA**

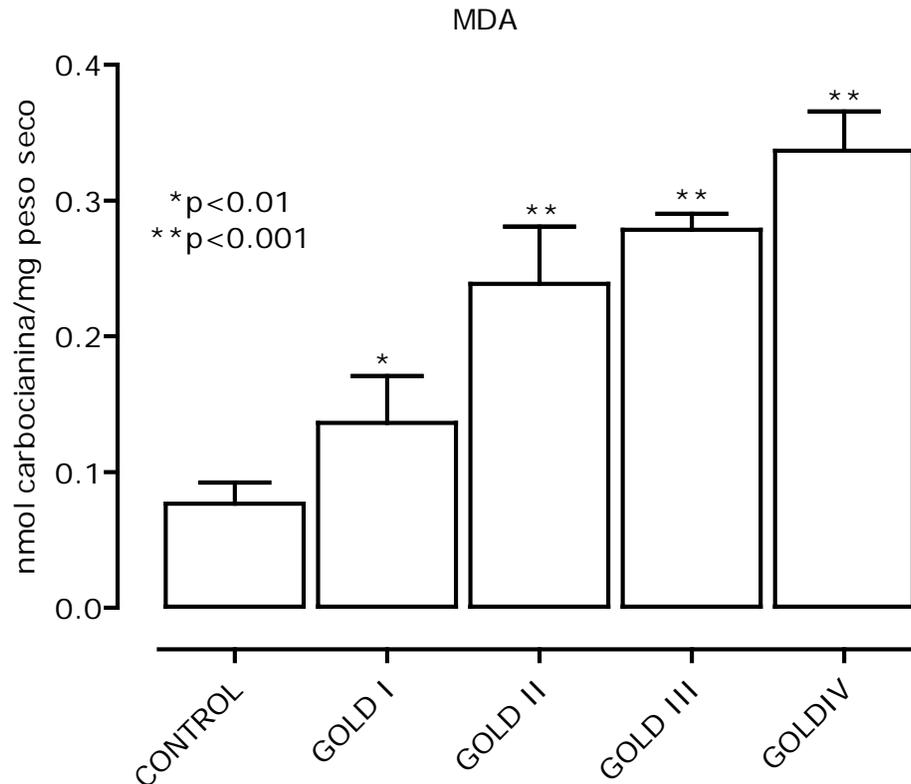
En la grafica 5 se observa que las concentraciones de LPH, presentaron un incremento en los biomarcadores conforme a la progresión de la EPOC (GOLD I, GOLD II, GOLD III, y GOLD IV) comparados con el grupo control. En la gráfica 1 se muestra la cuantificación de lipohidroperóxidos, a pesar de que no existe diferencia estadística entre el GOLD I y el grupo control, se puede inferir que entre el GOLD I, existe un aumento de 1.75 veces la concentración de lipohidroperóxidos comparado con el grupo control, con lo que respecta a el GOLD II ( $0.1002 \pm 0.031$  nmol de  $I_3$ /mg peso seco), GOLD III ( $0.1045 \pm 0.0085$  nmol de  $I_3$ /mg peso seco), GOLD IV ( $0.2511 \pm 0.033$ nmol de  $I_3$ /mg peso seco), presentaron un aumento estadísticamente significativo  $p < 0.001$ , comparado con el grupo control ( $0.0378 \pm 0.0057$  nmol de  $I_3$ /mg peso seco).

### Lipohidroperoxidos



Gráfica 5. Determinación de Lipohidroperóxidos en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

En la gráfica 6, se muestran las concentraciones plasmáticas de MDA, las cuales fueron incrementando de acuerdo a la progresión de la EPOC, el GOLD I ( $0.1363 \pm 0.034$  nmol carbocianina/mg peso seco) presenta un incremento significativo  $p<0.01$  con respecto al grupo control ( $0.076 \pm 0.015$  nmol carbocianina/mg peso seco) para los estadios II, III y IV ( $0.238 \pm 0.04$ ,  $0.278 \pm 0.01$  y  $0.336 \pm 0.02$  nmol carbocianina/mg de peso seco, respectivamente) se presentó un incremento significativo  $p<0.001$ , en comparación con el control ( $0.076 \pm .015$  nmol carbocianina/mg de peso seco).

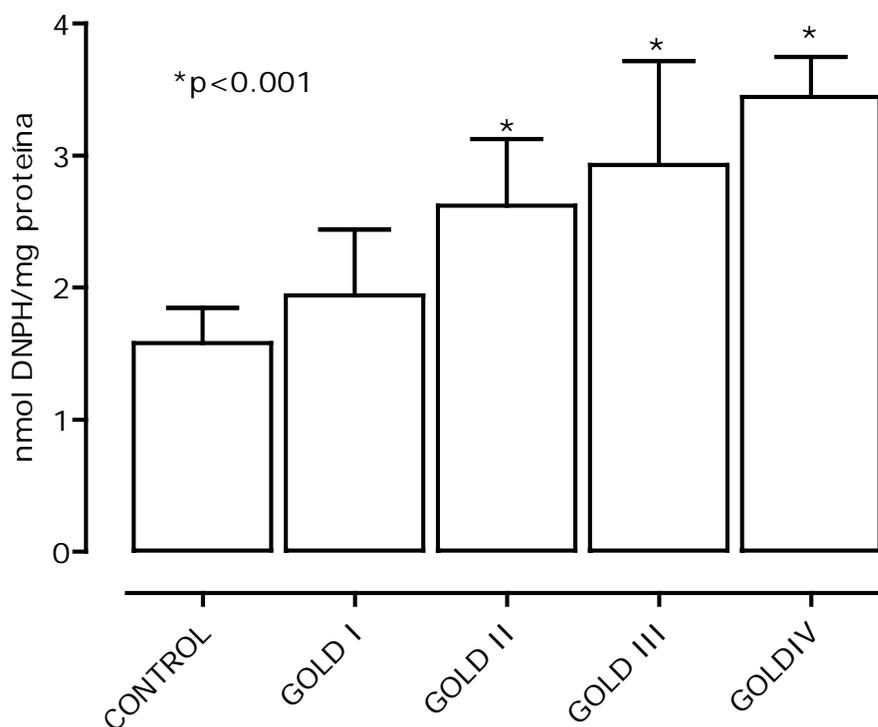


Gráfica 6. Determinación de Malondialdehído en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

La grafica 7 muestra las concentraciones de la carbonilación de proteínas, en donde GOLD II, GOLDIII, GOLD IV, presentaron diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.001$  ( $2.62 \pm 0.53$ ,  $2.92 \pm 0.788$ ,  $3.44 \pm 0.303$ , nmol DNPH/mg proteína, respectivamente) comparada con el grupo control ( $1.58 \pm 0.26$  nmol DNPH/mg proteína).

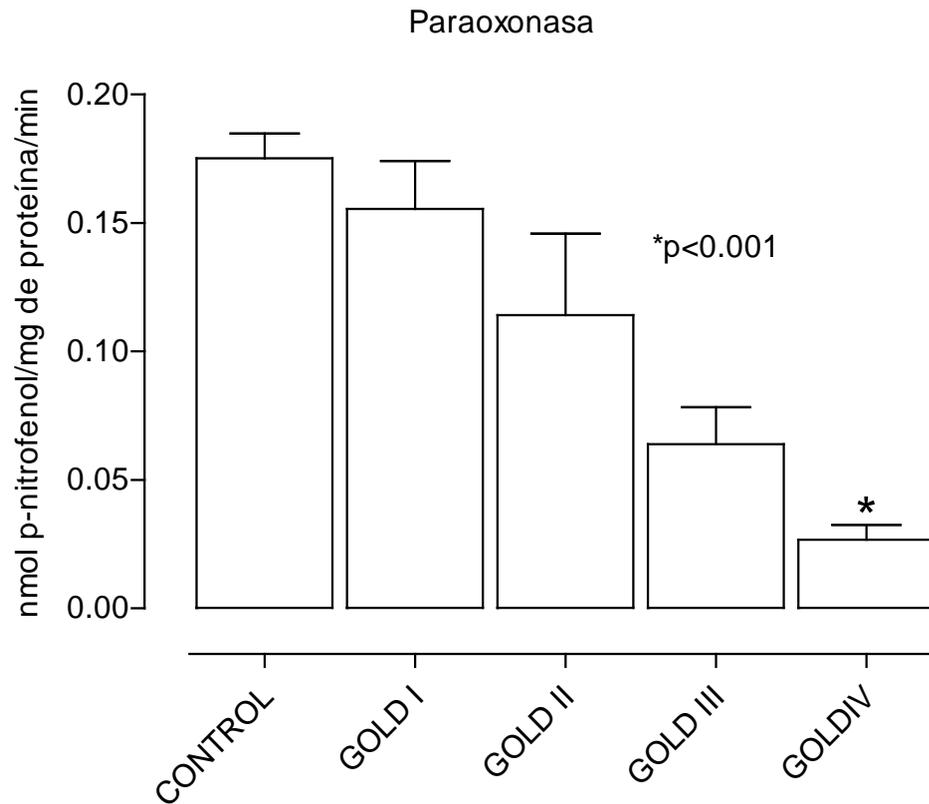
En todos los parámetros mostrados (LPH, MDA y carbonilación de proteínas) el valor del GOLD IV, representa el valor máximo obtenido en comparación con el grupo control, el aumento fue de 6.6 veces para LPH, el de MDA de 4.3 y para la carbonilación de proteínas fue de 2.17 veces, todos con respecto al control.

### Carbonilación de Proteínas



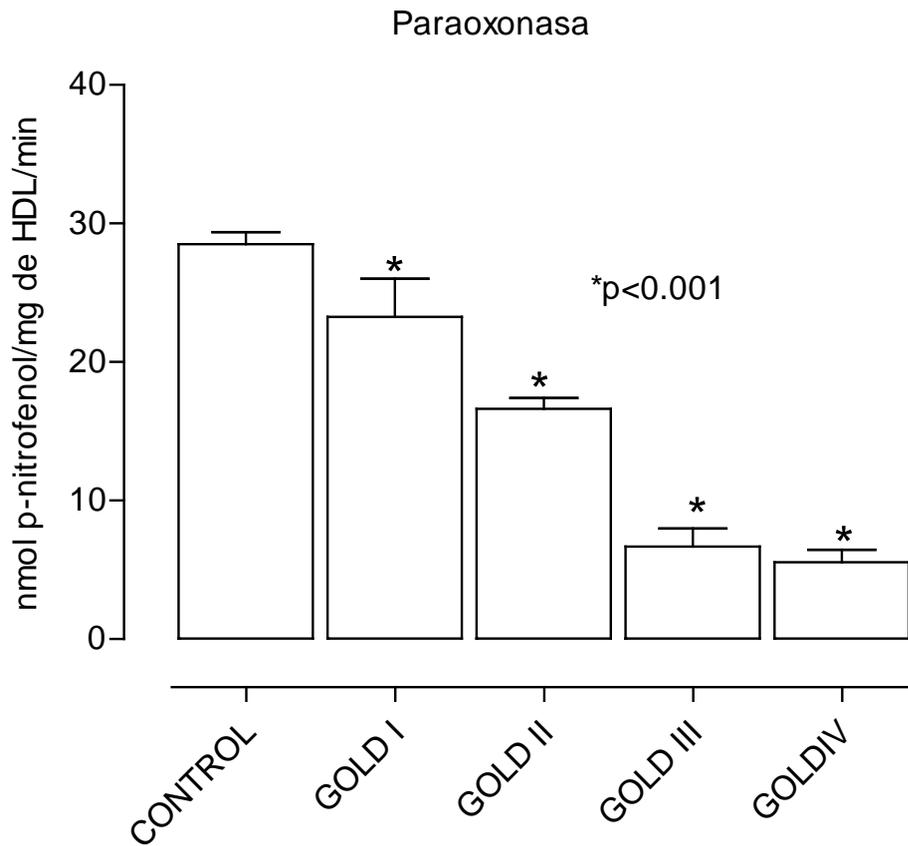
Gráfica 7. Determinación de Malondialdehído en plasma en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

La gráfica 8A muestra la actividad enzimática de Paraoxonasa expresada por nmol de p-nitrofenol/mg de proteína/min. Se puede observar una disminución estadísticamente significativa en la actividad de paraoxonasa en el GOLD IV ( $p<0.001$ ), el cual representa un 85% de disminución en su actividad ( $0.026\pm 0.013$  nmol p-nitrofenol/mg proteína/min).



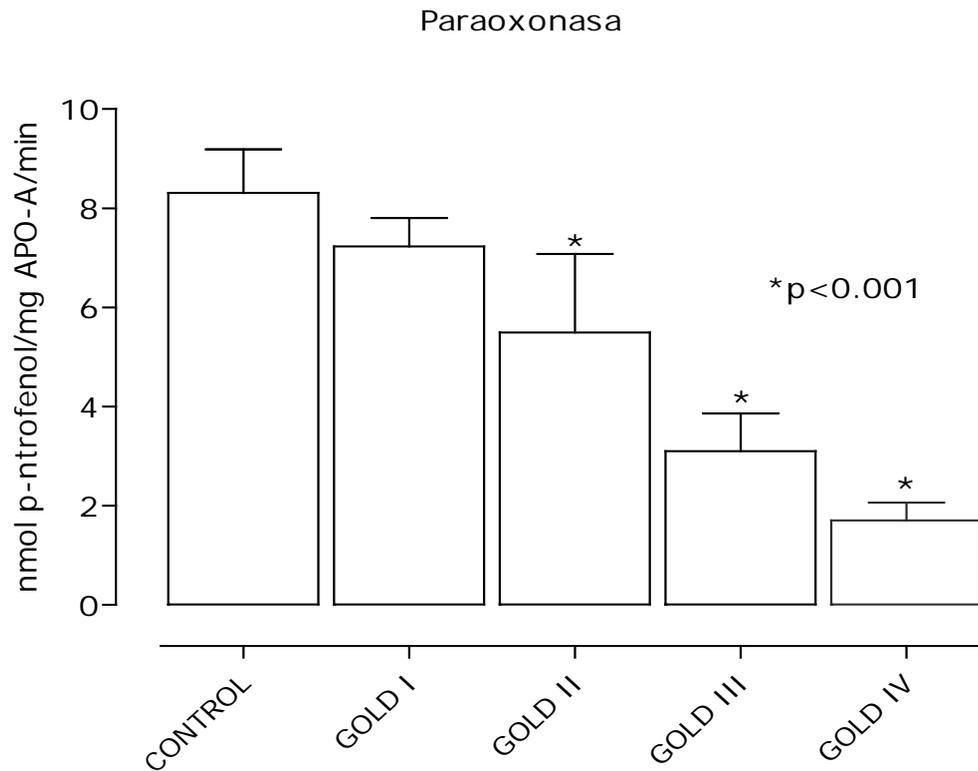
Gráfica 8A. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por mg de proteína, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

La gráfica 8B muestra la actividad enzimática de Paraoxonasa expresada por nmol de p-nitrofenol/mg de HDL/min. Se puede observar una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la eficiencia hidrolítica de paraoxonasa en los diferentes estadios de la EPOC ( $23.25 \pm 6.764$ ,  $16.61 \pm 3.06$ ,  $6.691 \pm 3.176$ , y  $5.56 \pm 2.01$  nmol de p-nitrofenol/mg de HDL/min), respectivamente, comparados con el control. ( $28.51 \pm 2.61$  nmol de p-nitrofenol/mg de HDL/min)



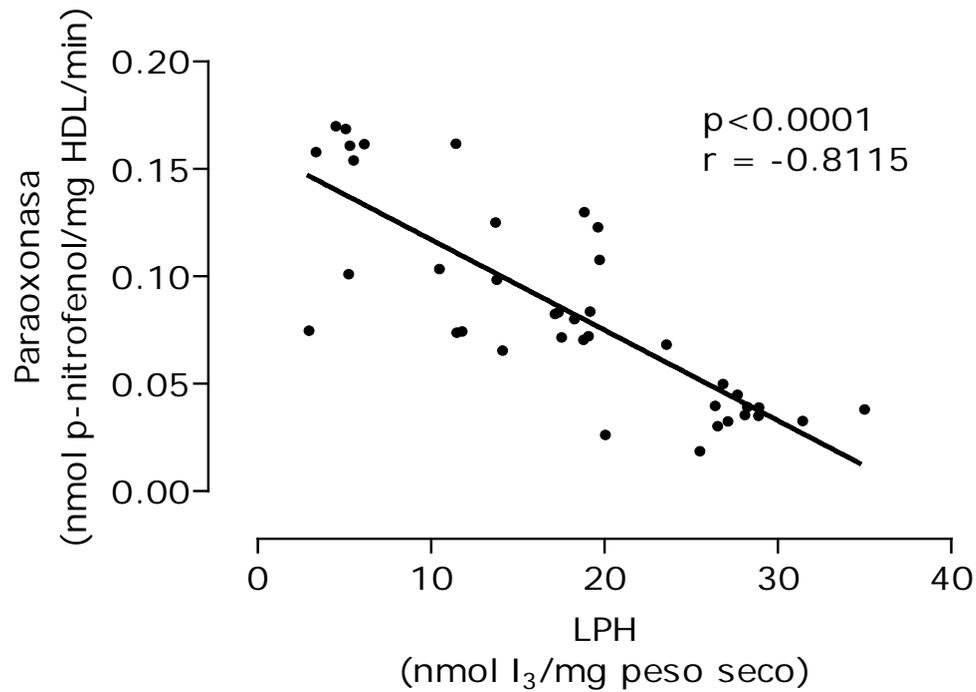
Gráfica 8B. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por mg de HDL, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

La gráfica 8C muestra la actividad enzimática de Paraoxonasa expresada por nmol de p-nitrofenol/mg de Apo-A/min. Se puede observar una disminución estadísticamente significativa en la eficiencia hidrolítica de paraoxonasa a partir del GOLD II ( $p < 0.001$ ), el cual representa un 33% de disminución en su actividad ( $5.49 \pm 1.58$  nmol p-nitrofenol/mg Apo-A/min), mientras que en el GOLD III, se presenta una disminución del 62% ( $3.10 \pm 0.76$  nmol p-nitrofenol/mg Apo-A/min) y finalmente el GOLD IV tubo una disminución del 79%, comparadas con el grupo control ( $8.31 \pm 0.87$  nmol p-nitrofenol/mg Apo-A/min).

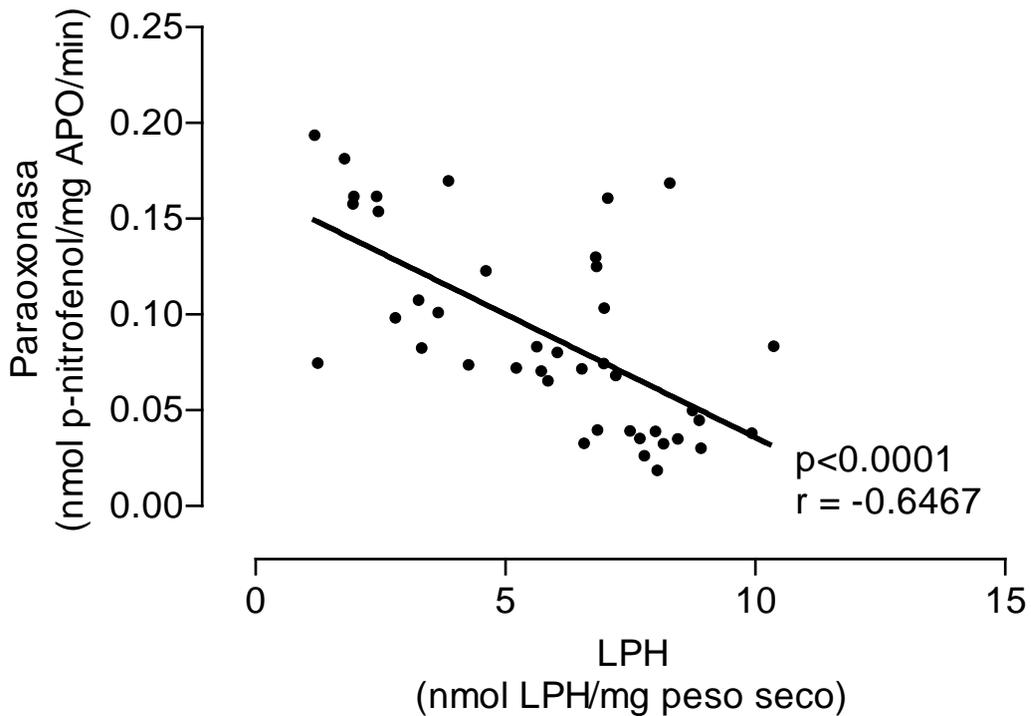


Gráfica 8C. Determinación de la actividad plasmática de Paraoxonasa expresada por nmol p-nitrofenol/mg Apo-A/min, en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

La gráfica 9A muestra la correlación que existe entre Paraoxonasa (expresada por HDL), con su sustrato (LPH), formado durante el proceso de lipoperoxidación, presenta una correlación negativa ( $r = -0.8115$ ) con una diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.0001$ . La gráfica 9B muestra la misma correlación, pero en esta gráfica la paraoxonasa se encuentra expresada por Apo-A, esta presenta una correlación negativa ( $r = -0.6467$ ), podemos observar que la correlación es mayor cuando expresamos la actividad de Paraoxonasa por HDL.

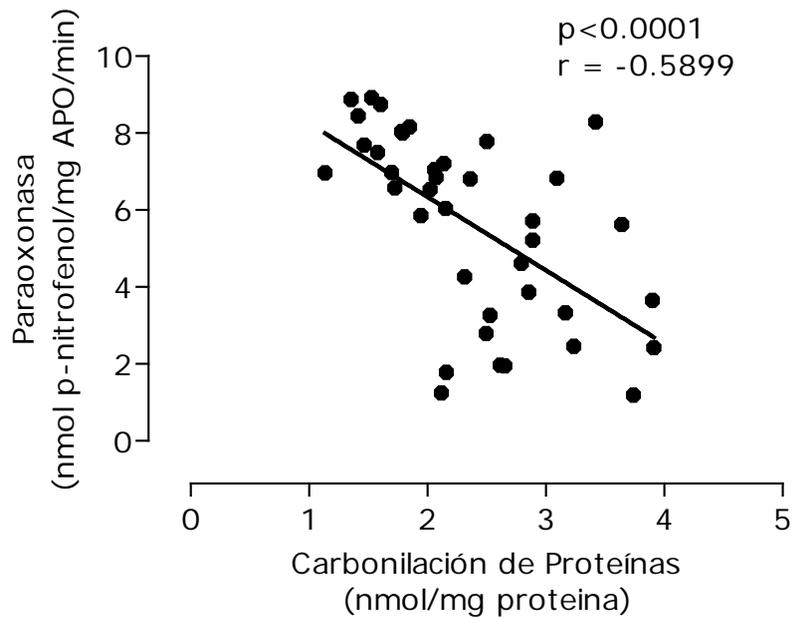


Gráfica 9A. Correlación negativa entre Paraoxonasa (expresada por HDL) y su sustrato lipohidroperóxidos



Gráfica 9B. Correlación negativa entre Paraoxonasa (expresada por Apo-A) y su sustrato lipohidroperóxidos

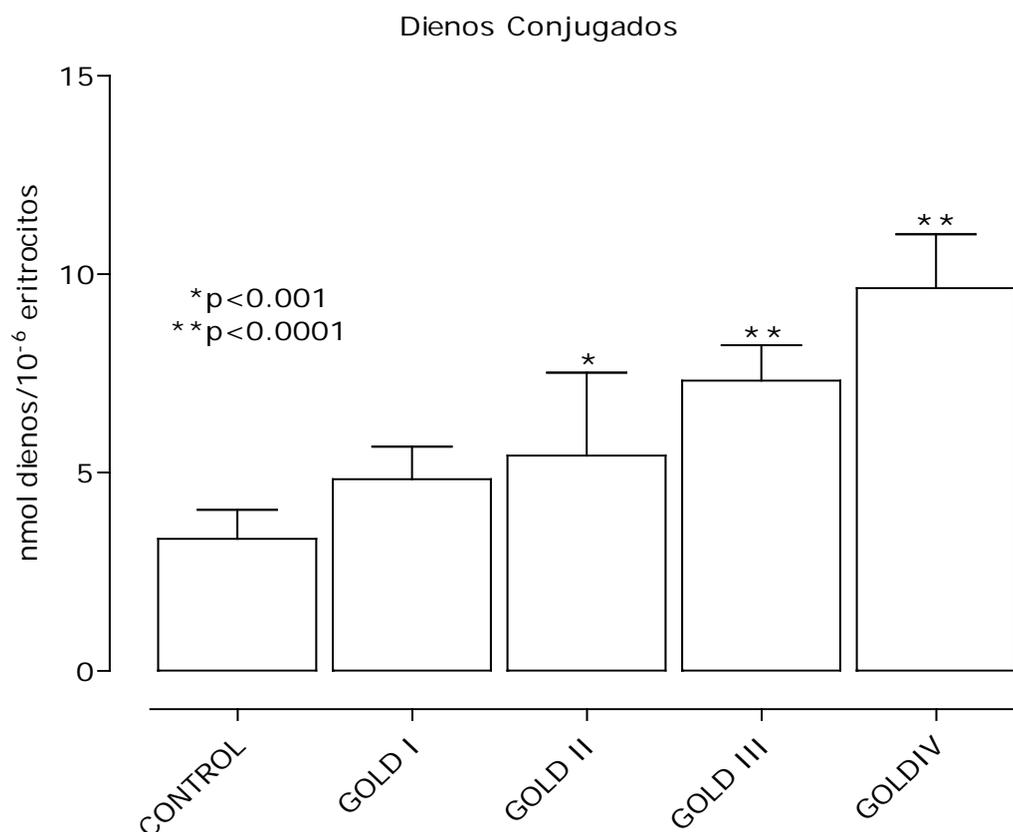
En la gráfica 10 se muestra una correlación negativa ( $r = -0.5899$ ) de paraoxonasa comparado con un marcador de daño la carbonilación de proteínas ( $p < 0.0001$ ).



Gráfica 10. Correlación negativa entre Paraoxonasa y la carbonilación de proteínas.

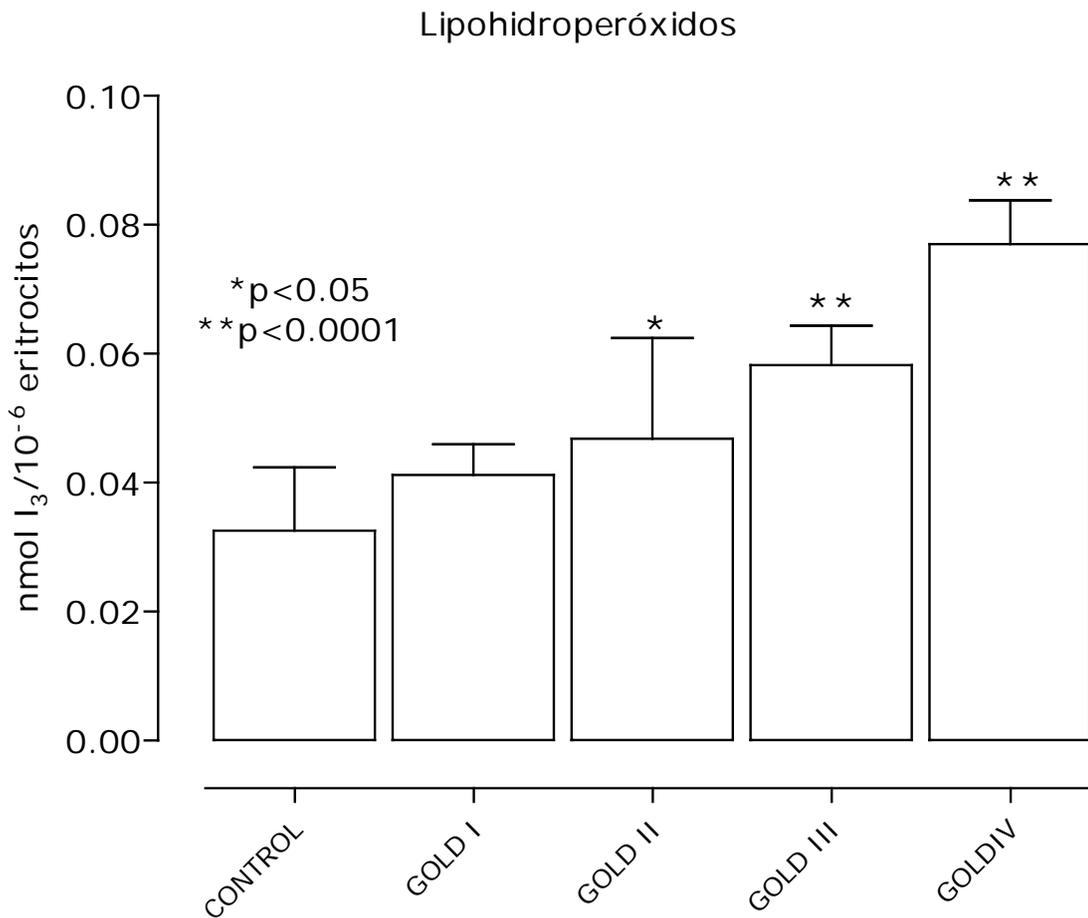
#### 7.4.1.2 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO DETERMINADOS EN MEMBRANAS DE ERITROCITO.

En la gráfica 11 se muestra la cuantificación de dienos conjugados, primer producto del proceso de lipoperoxidación, se presento un incremento estadísticamente significativo  $p < 0.001$  entre el GOLD II ( $0.35 \pm .042$  nmol dienos/ $10^{-6}$  eritrocitos), comparado con el control ( $0.287 \pm .057$  nmol dienos/ $10^{-6}$  eritrocitos), mientras que el GOLD III y GOLD IV presentaron un aumento estadísticamente significativo  $p < 0.0001$  ( $0.284 \pm .068$ ,  $0.221 \pm 0.008$ , nmol dienos/ $10^{-6}$  eritrocitos respectivamente) comparado con el grupo control. La formación de dienos fue 76% mayor en GOLD IV comparada con los eritrocitos del grupo control.



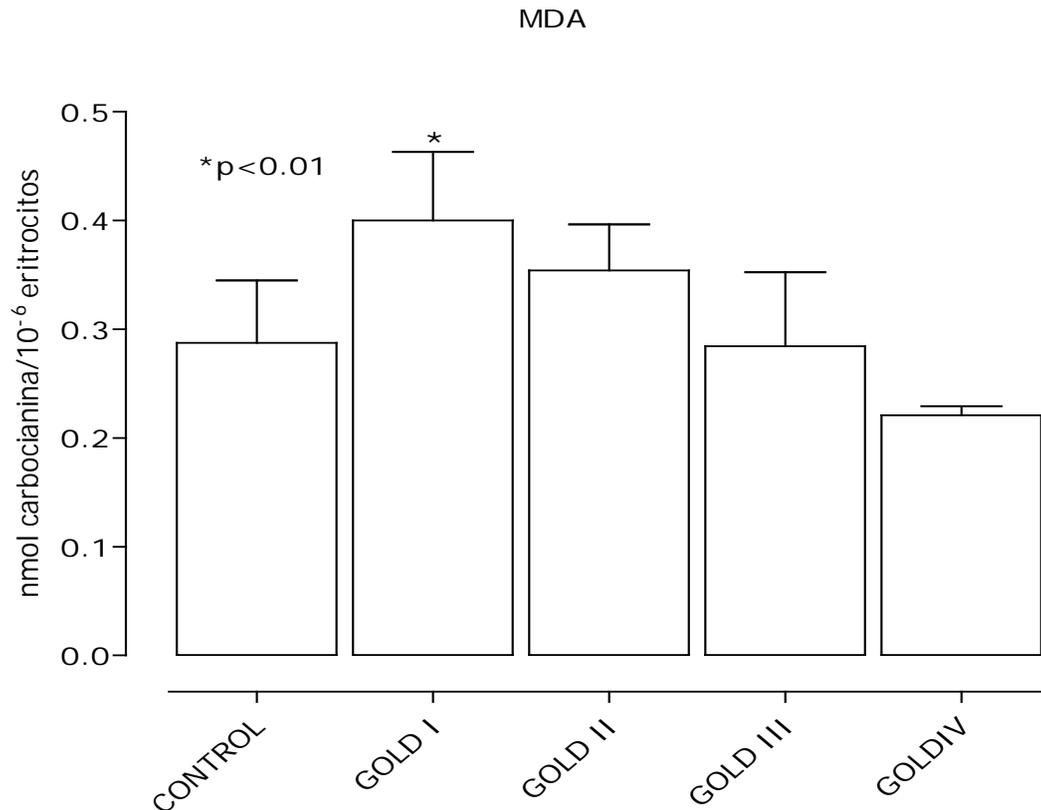
Gráfica 11. Determinación de Dienos conjugados en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control.

En la gráfica 12, se muestra la formación de lipohidroperóxidos, segundo producto del proceso de lipoperoxidación, el GOLD II ( $0.046 \pm 0.015$  nmol  $I_3/10^{-6}$  eritrocitos) presenta un aumento estadísticamente significativo  $p<0.05$  en comparación con el grupo control ( $0.032 \pm 0.009$  nmol  $I_3/10^{-6}$  eritrocitos), con lo que respecta a el GOLD III ( $0.58 \pm 0.006$  nmol  $I_3/10^{-6}$  eritrocitos) y GOLD IV ( $0.77 \pm 0.0068$  nmol  $I_3/10^{-6}$  eritrocitos), presentan un aumento significativo  $p<0.0001$  con respecto a el control. El incremento que se presenta en los pacientes GOLD IV representa 2.5 veces más (0.077), que el grupo control (0.032).



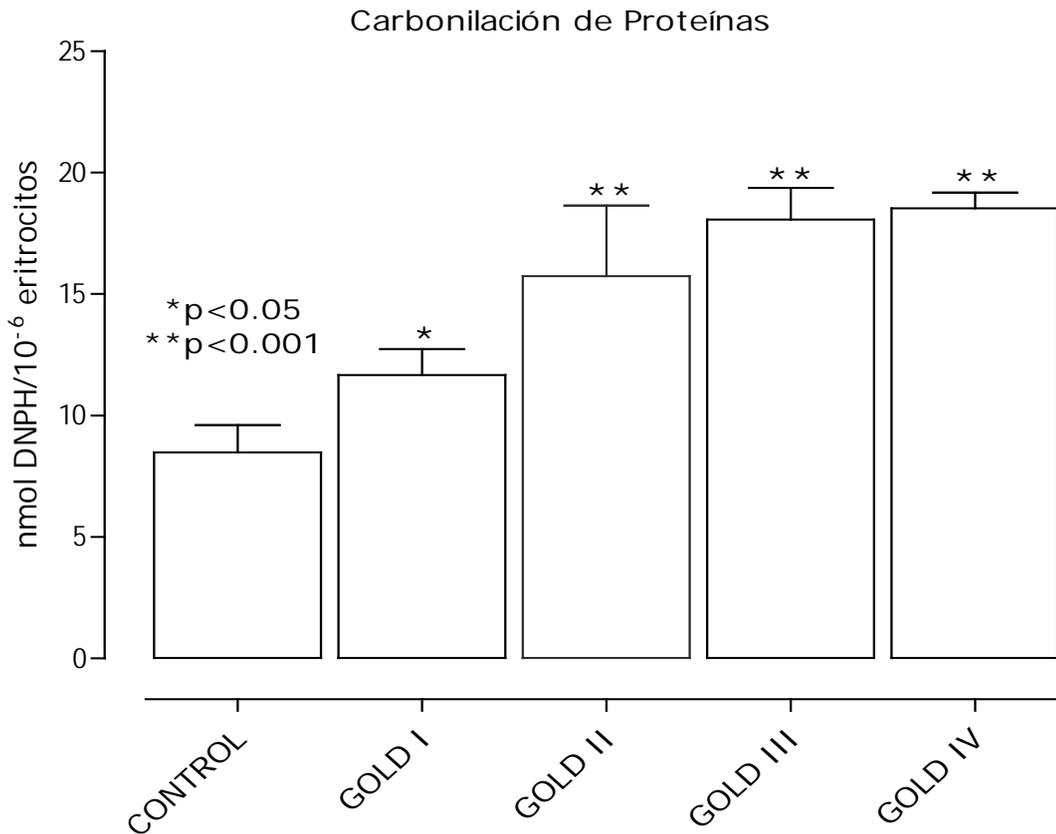
Gráfica 12. Determinación de Lipohidroperóxidos en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

En la gráfica 13 se observa la concentración de MDA, producto final de la lipoperoxidación en los diferentes estadios de la EPOC, encontrando únicamente diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.01$  en el GOLD I ( $0.40 \pm .062$  nmol carbocianina/ $10^{-6}$  eritrocitos), comparada con el grupo control ( $0.28 \pm .057$  nmol carbocianina/ $10^{-6}$  eritrocitos).



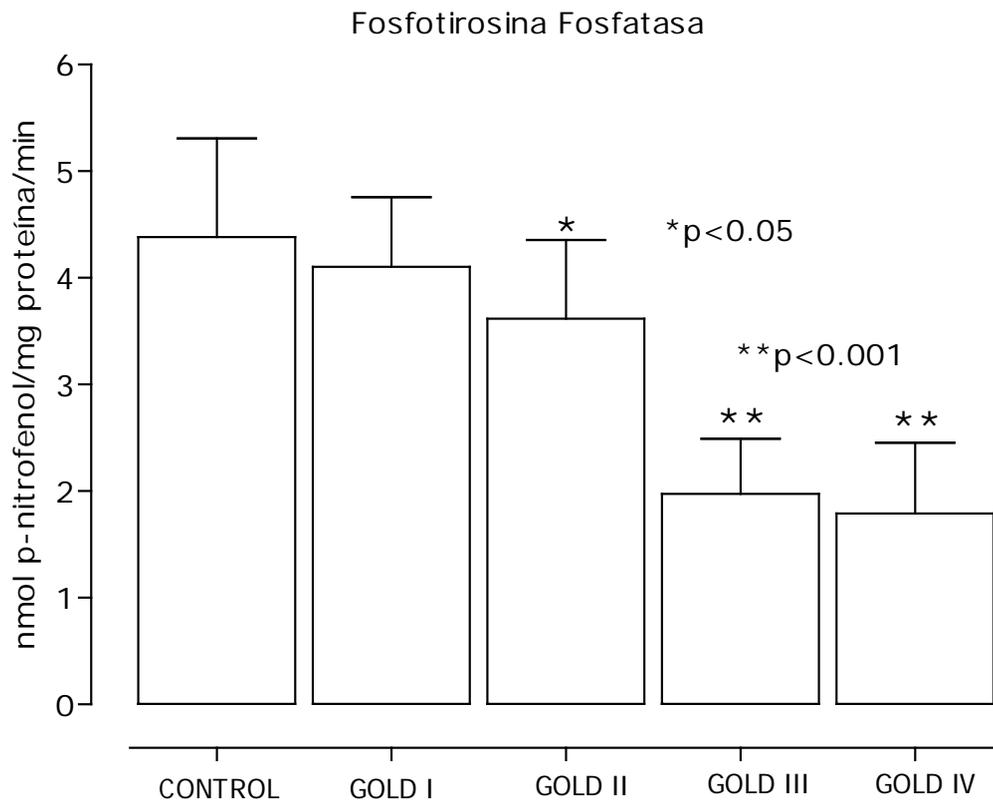
Gráfica 13. Determinación de Malondialdehído en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

En la grafica 14 se presenta la cuantificación en la carbonilación de proteínas, se puede observar que la carbonilación de proteínas incrementa conforme va evolucionando la EPOC, se encontró diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$  para GOLD I ( $11.67 \pm 1.07$  nmol DNPH/ nmol I<sub>3</sub>/10<sup>-6</sup> eritrocitos), mientras que el GOLD II, III y IV presentaron diferencias significativas con una  $p < 0.001$  ( $15.74 \pm 2.892$ ,  $18.06 \pm 1.311$ ,  $18.53 \pm 0.651$  DNPH/ nmol I<sub>3</sub>/10<sup>-6</sup> eritrocitos respectivamente) todas comparadas contra el grupo control ( $8.47 \pm 1.12$  DNPH/ nmol I<sub>3</sub>/10<sup>-6</sup> eritrocitos).



Gráfica 14. Determinación de la carbonilación de proteínas en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

En la gráfica 15 se observa la actividad enzimática de la fosfotirosina fosfatasa (FTF), proteína asociada a la proteína banda 3, se presenta un decremento significativo  $p < 0.001$ , únicamente en los estadios GOLD III ( $1.97 \pm 0.51$  nmol p-nitrofenol/mg prot/min) y GOLD IV ( $1.78 \pm 0.66$  nmol p-nitrofenol/mg prot/min). Comparados con el grupo control. La disminución presentada en el GOLD III y GOLD IV, representa un 55% y 59% respectivamente, comparada con el grupo control. Mientras que le GOLD II solo presento una disminución del 20%.



Gráfica 15. Determinación de la actividad enzimática de Fosfotirosina Fosfatasa en membranas de eritrocito en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparados con el grupo control

## 7.4.2 SEGUNDA ETAPA

### 7.4.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS PM

Mediante microscopía electrónica de barrido fueron evaluados alrededor de 100 filtros, para determinar la morfología de las PM, dos de las más representativas se muestran en la figura 11 para  $PM_{10}$  y figura 12 para  $PM_{2.5}$ . La clasificación morfológica y la composición elemental de las  $PM_{10}$  en su fracción fina ( $<2,5$  micras) fueron desarrolladas por CENICA (Tabla 6). Las figuras 11 y 12 ilustran las diversas formas que presentan las partículas. Las fuentes de la PM se describen en las leyendas de ambas figuras. La morfología de las partículas esta relacionada con la composición química y se puede correlacionar con la fuente de emisión. Las formas predominantes fueron esférica ( $n = 20$ ), grupos ( $n = 27$ ), irregulares ( $n = 70$ ) y forma agregada o reticular de los agregados de hollín ( $n = 38$ ). La Tabla 6 muestra los análisis individuales por fluorescencia de rayos X correspondientes a las figuras 11 y 12. Los análisis cuantitativos indican que el carbono y el oxígeno, probablemente derivadas de la combustión incompleta de combustibles fósiles, fueron los componentes principales. Estos elementos representan el 68% a 94% de la fracción gruesa y 74% a 76% de la fracción fina. Los elementos metálicos contribuyeron en un 2,5% de los secundarios y el 2% de las fracciones finas. El hierro fue el metal más abundante en las partículas esféricas (0,56% a 50,57%), mientras que el cobre se encontró en los agregados de hollín y en las partículas irregulares ( $> 1,5\%$ ). El aluminio, calcio y potasio también fueron identificados y detectados principalmente en partículas irregulares, mientras que el zinc no se encontró en las muestras. El tamaño de partícula y la forma están relacionados con la fuente original que la género.

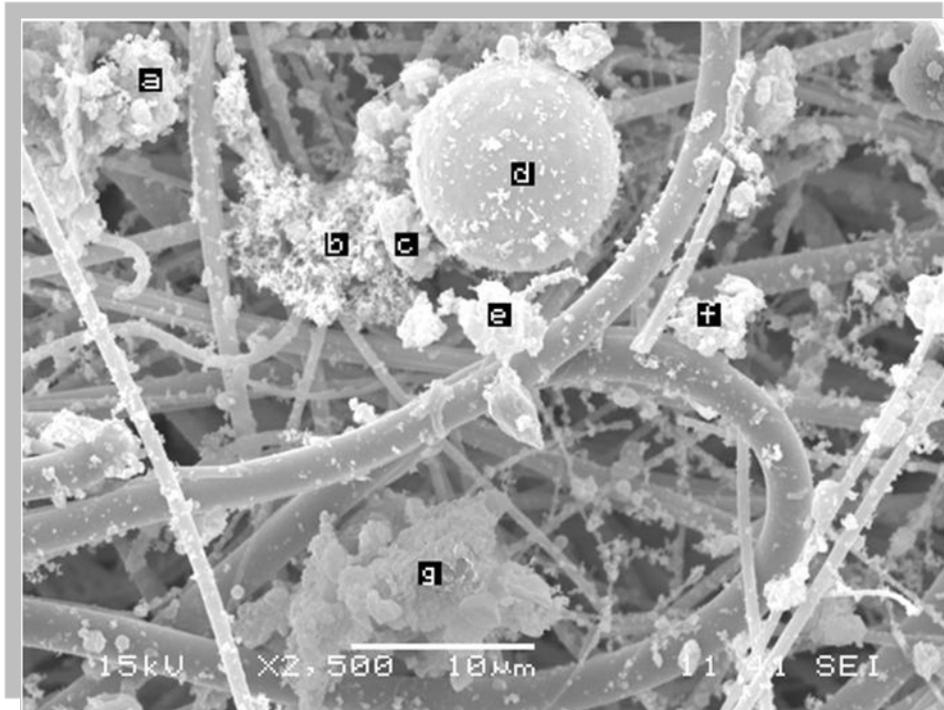


Figura 11. Fotomicrografía de partículas contaminantes obtenidas de la Ciudad de México. Las letras (a), (c) y (g), corresponden a los agregados de  $PM_{10}$ ; la (e) y la (f) son fragmentos de  $PM_{2.5}$ ; (d) es una  $PM_{10}$  esférica, los elementos más abundantes fueron partículas de carbono, oxígeno, silicio, potasio, calcio y hierro.

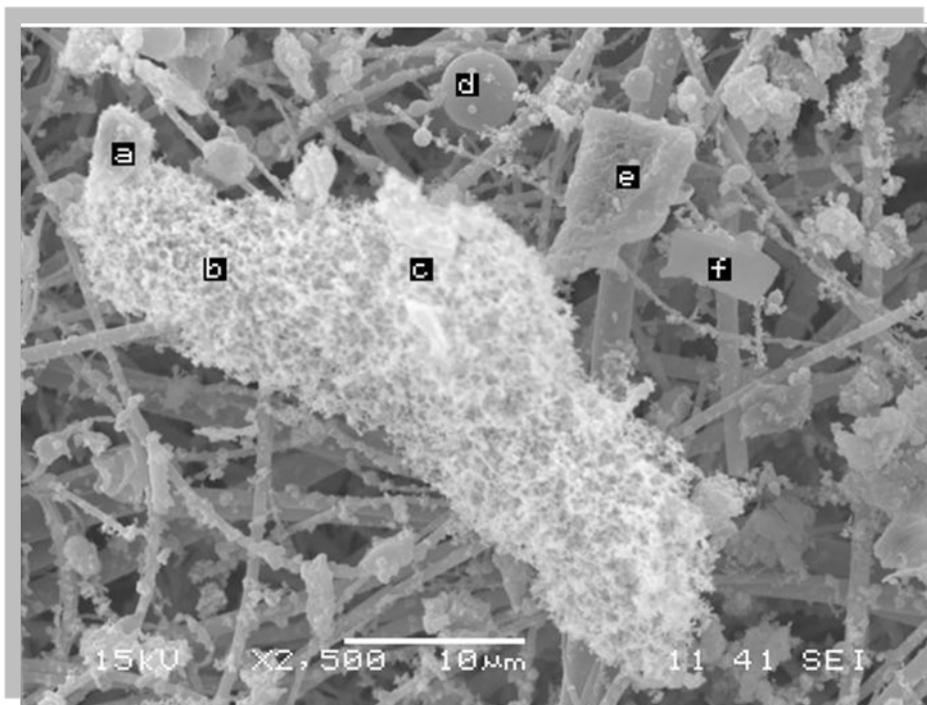


Figura 12. Fotomicrografía de partículas contaminantes obtenidas de la Ciudad de México. Las letras (a), (c) y (e) corresponden a fragmentos de  $PM_{2.5}$ ; (f) representan fragmentos de  $PM_{10}$ ; (d) representa una  $PM_{10}$  esférica y (b) es una partícula de carbono que forma parte de las nanopartículas.

Tabla 6. Composición del material particulado

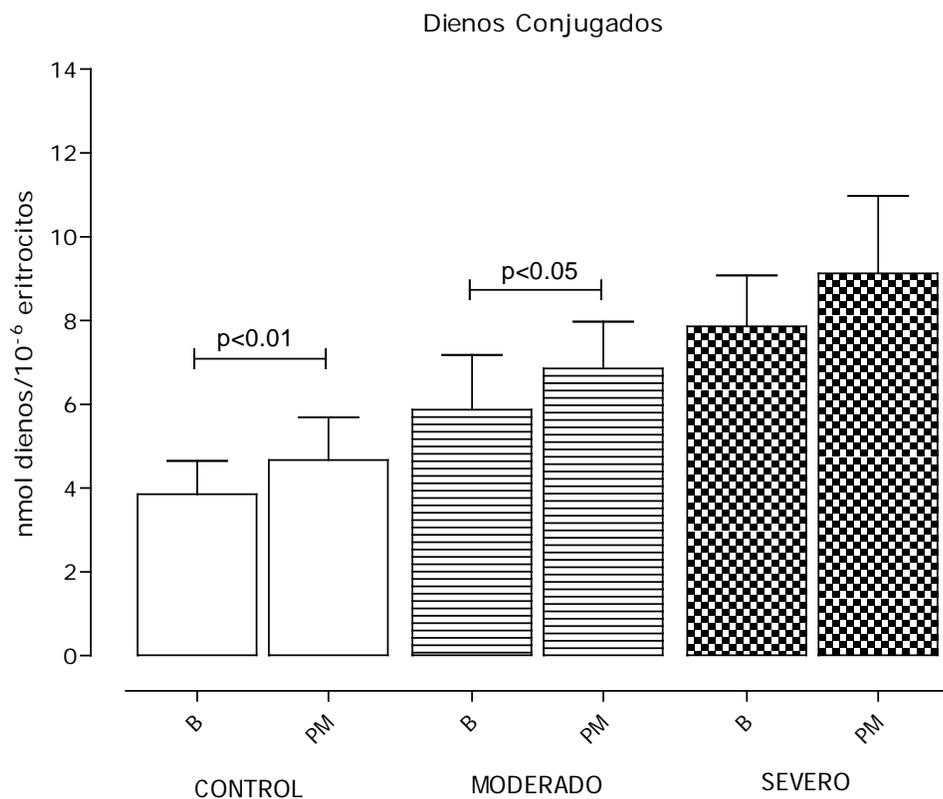
PM <sub>10</sub> en su fracción fina (< 2.5 µm)												
Elementos	Esférica			Cluster			Irregular			Hollín		
	n=20			n=27			n=70			n=38		
	Min	Max	n	Min	Max	n	Min	Max	n	Min	Max	n
<b>C</b>	12.97	60.23	20	20.63	58.73	27	18.81	60.8	70	23.08	53.98	38
<b>O</b>	27.19	45.38	20	28.91	44.33	27	25.17	53.52	70	21.51	41.89	38
<b>Na</b>	0.35	0.94	7	0.31	11.27	15	0.31	3.32	38	0.32	1.61	15
<b>Mg</b>	0.23	8.91	9	0.31	6.69	10	0.34	13.02	33	0.25	1.22	7
<b>Al</b>	0.43	9.6	10	0.47	7.31	22	0.65	17.91	52	0.37	3.77	11
<b>Si</b>	6.86	28.27	20	5.07	29.54	27	3.65	51	69	8.11	44.93	38
<b>P</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>S</b>	nd	nd		nd	nd		0.51	1.87	3	nd	nd	
<b>Cl</b>	0.09	2.56	3	0.35	3.15	4	0.25	7.72	9	nd	nd	
<b>K</b>	0.31	4.26	11	0.31	4.91	15	0.16	7.21	50	0.24	4.55	18
<b>Ca</b>	0.31	3.28	17	0.28	10.23	22	0.23	21.87	63	0.22	2.88	22
<b>Ti</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>V</b>	0.29	1.08	2	nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Cr</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Mn</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Fe</b>	0.56	50.57	8	0.37	6.19	14	0.38	32.76	43	0.38	0.92	5
<b>Cu</b>	0.47	1	4	nd	nd		0.66	1.63	7	0.52	1.54	4
<b>Zn</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	

Nd= no determinados  
 Datos representados en %

#### 7.4.2.2 BIOMARCADORES DE ESTRES OXIDATIVO EN ERITROCITOS EXPUESTOS A PM

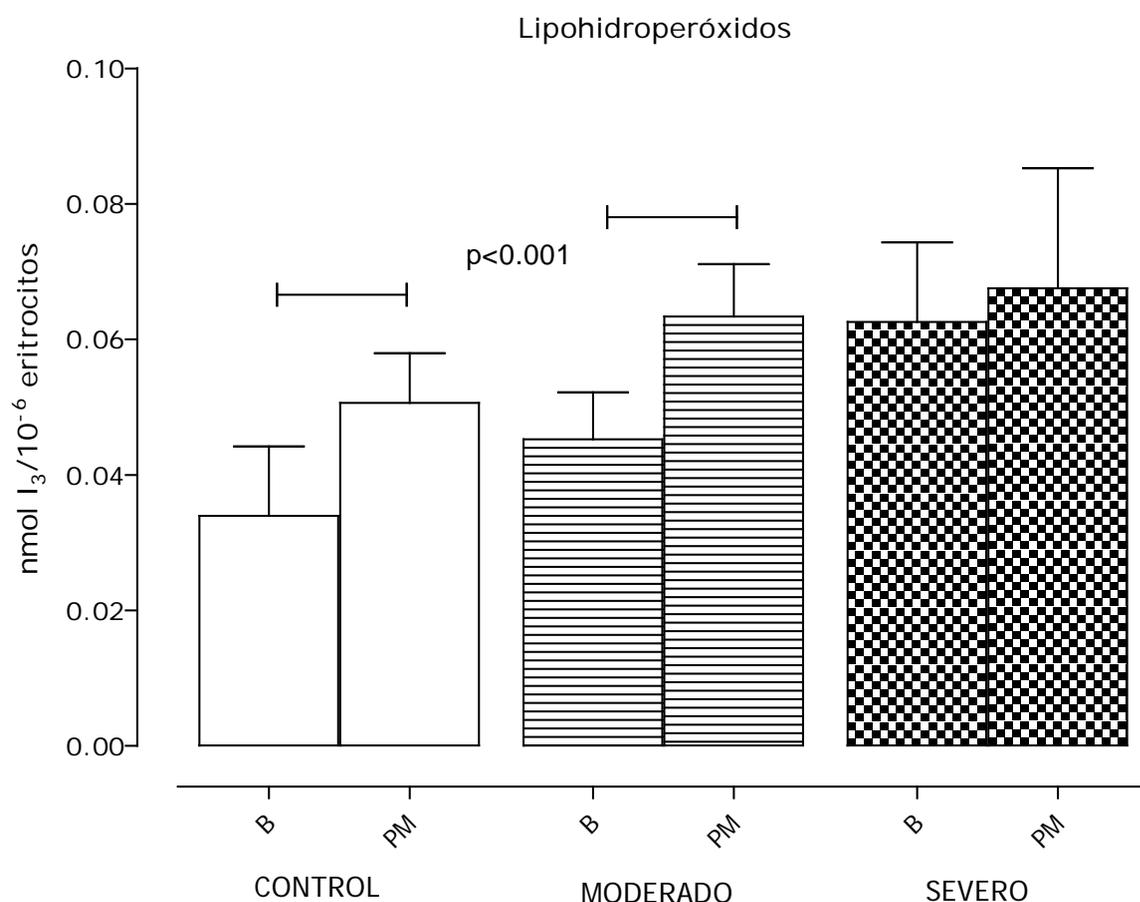
A continuación se presentan los resultados de los biomarcadores de daño por estrés oxidativo, obtenidos de la exposición de material particulado a membranas de eritrocitos y de la cuantificación de marcadores bioquímicos en citosol de pacientes con EPOC leve y moderada así como el grupo control.

La Gráfica 16 representa los cambios estructurales en las membranas de los eritrocitos ocasionados por el proceso de lipoperoxidación en pacientes con EPOC y en el grupo control, se puede observar que el grado de daño oxidativo incrementa conforme a la progresión de la enfermedad. Después de la exposición a los eritrocitos con PM, la formación de dienos conjugados aumentó un 17,5% en pacientes con EPOC moderada comparada con las membranas no tratadas y un 16,6% en pacientes con EPOC severa, aunque en este grupo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con las membranas no tratadas.



Gráfica 16. Determinación de Dienos conjugados en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a PM<sub>2.5</sub>, en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

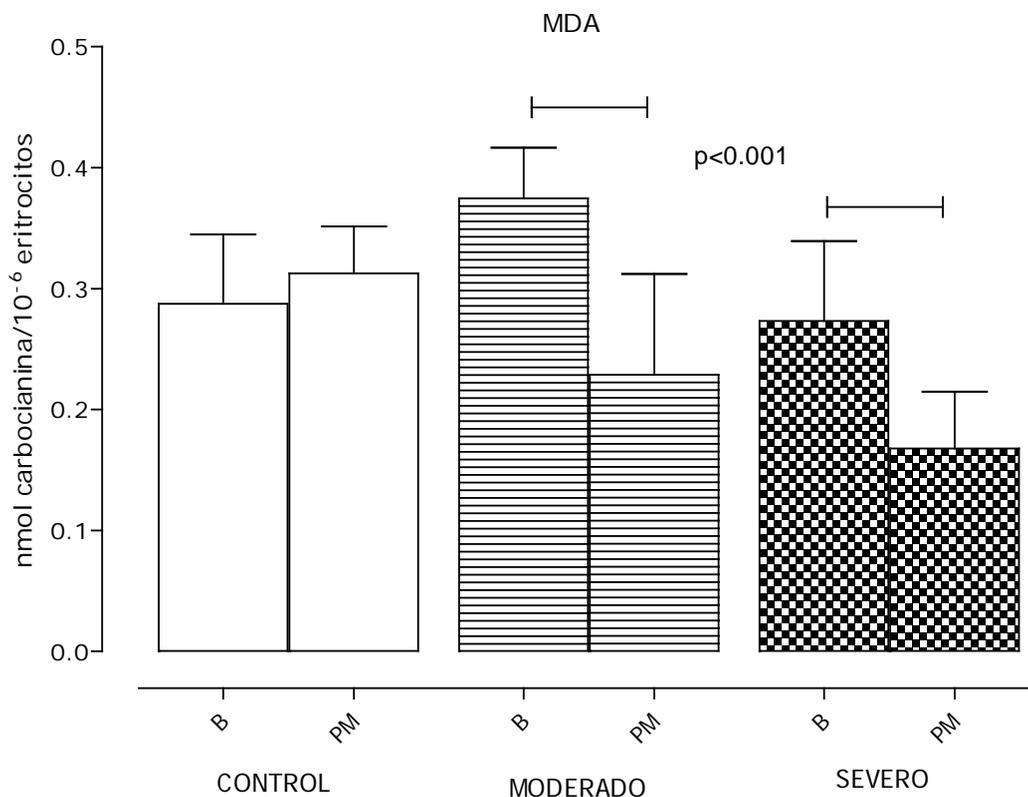
La gráfica 17 representa la formación de LPH en membranas de eritrocito, se puede observar que en el grupo control hay un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en la formación de LPH del 33% en membranas de eritrocitos cuando son expuestas a las  $PM_{2.5}$  comparadas con sus cifras basales; mientras que el grupo de EPOC moderada presentó un incremento significativo (29%) con una  $p < 0.001$ , mientras que el grupo de EPOC severo presentó un aumento del 7.4%, lo cual no representa una diferencia estadísticamente significativa. Cuando los diferentes grupos son expuestos a las  $PM_{2.5}$ , se presentó un incremento en el grupo control expuesto a PM ( $0.03 \pm 0.01$  y  $0.05 \pm 0.007$  nmol  $I_3/10^6$  eritrocitos), pero no llega a los niveles de los pacientes con EPOC moderada o grave ( $0.06 \pm 0.007$  a  $0.067 \pm 0.017$  nmol  $I_3/10^6$  eritrocitos), lo que indica que el daño oxidativo preexiste en pacientes con EPOC.



Gráfica 17. Determinación de Lipohidroperóxidos en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

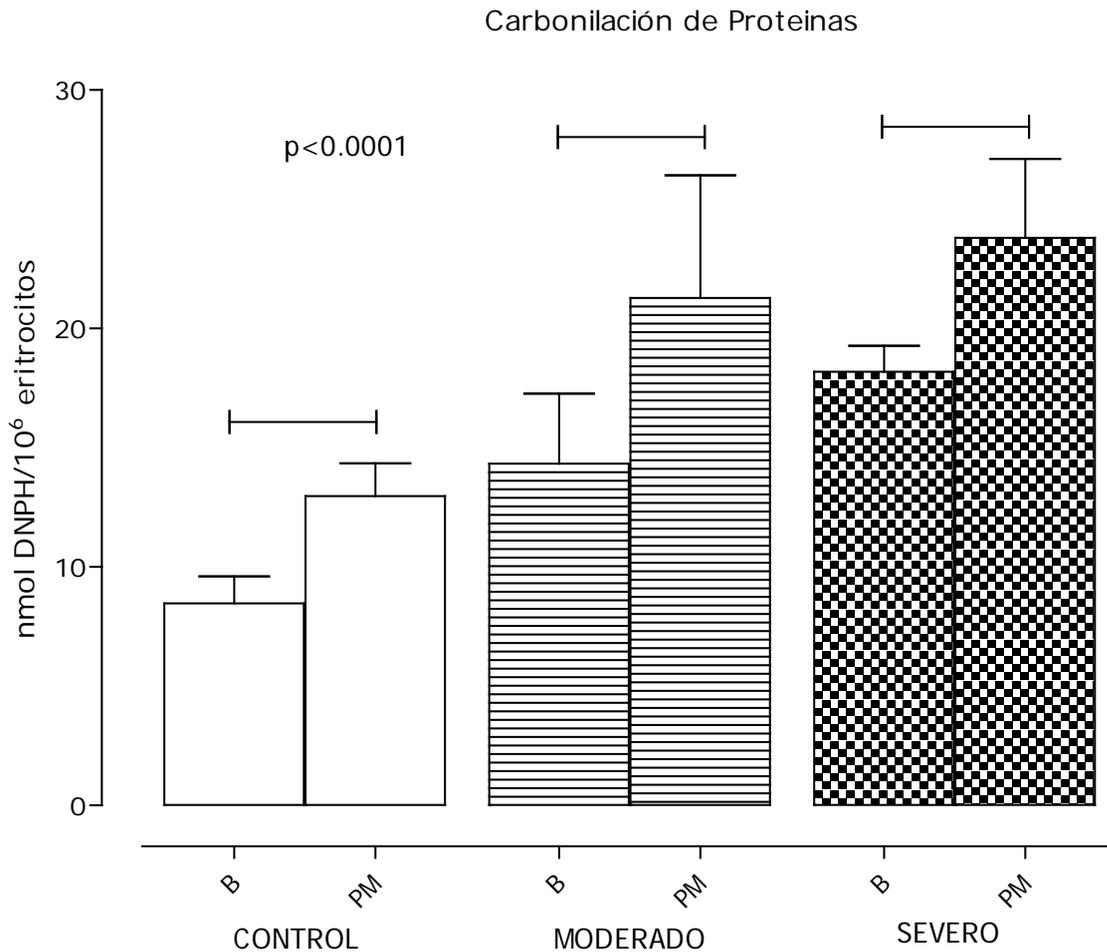
En la gráfica 18 se muestra la concentración de MDA, la cual presentó una disminución significativamente ( $p < 0.001$ ), en ambos grupos de la EPOC (moderada y severa), el

porcentaje de disminución para el grupo moderado y severo representan un 34% y un 38% respectivamente, comparados con las cifras basales de cada grupo; mientras que en el grupo control no presento una disminución significativa del MDA después de la incubación con PM ( $0.28 \pm 0.05$  a  $0.31 \pm 0.04$ ; nmol de carbocianina/mg peso seco).



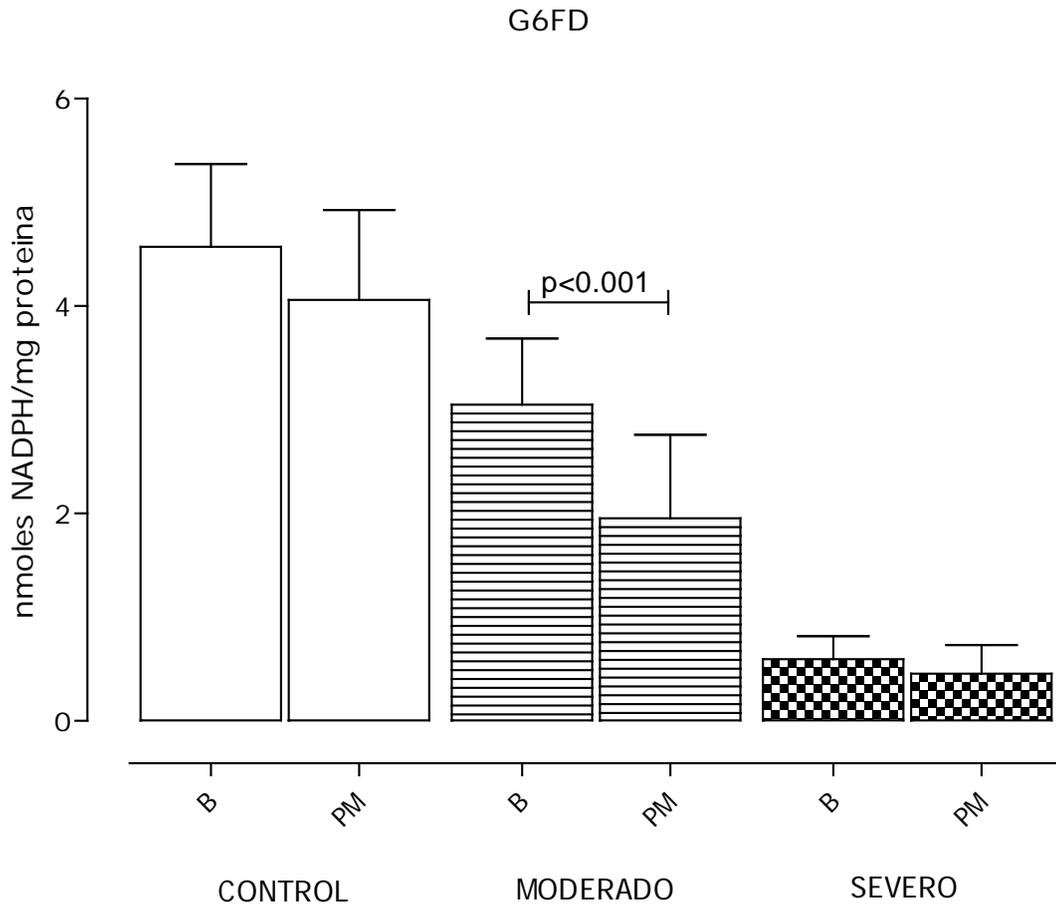
Gráfica 18. Determinación de Malondialdehído en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a PM<sub>2.5</sub>, en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

La gráfica 19 muestra la concentración en la carbonilación de proteínas; en donde se observe un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) en los tres grupos cuando las membranas de eritrocitos son expuestas a las PM<sub>2.5</sub>, el grupo control presento una aumento del 53% comparado con sus cifras basales ( $8.48 \pm 1.12$  nmol DNPH/mg proteína), el grupo de EPOC moderada y severa presentaron un incremento del 49% y del 30% respectivamente comparadas con las cifras basales correspondientes a cada grupo ( $14.33 \pm 2.94$  y  $18.19 \pm 1.088$  nmol DNPH/mg proteína) respectivamente.



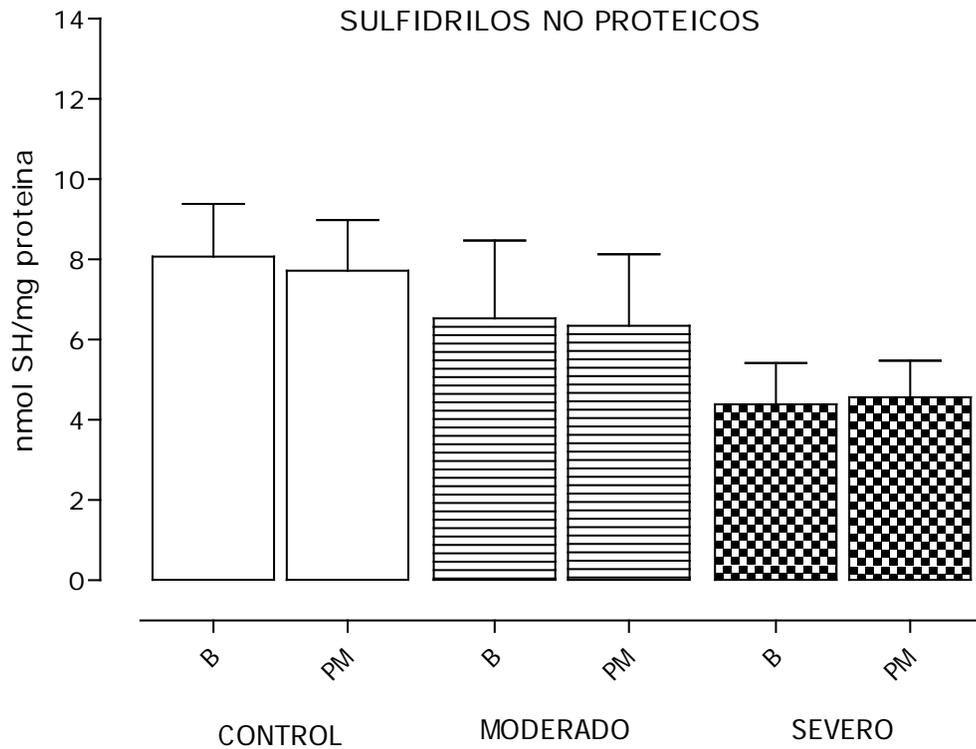
Gráfica 19. Determinación de la carbonilación de proteínas en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

La gráfica 20 muestra la actividad enzimática de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6FD), determinada en el citosol de eritrocitos. La actividad de la G6FD en el grupo control como en el grupo de EPOC severa no presentaron diferencias estadísticamente significativas, antes y después de ser expuestos a las  $PM_{2.5}$ . En el grupo de EPOC moderada se presenta una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la actividad enzimática de la G6FD del 34%, debido a la incubación con las  $PM_{2.5}$  ( $1.95 \pm 0.8$  nmol NADPH/mg de proteína) comparada con sus cifras basales ( $3.049 \pm 0.6$  nmol NADPH/mg de proteína).



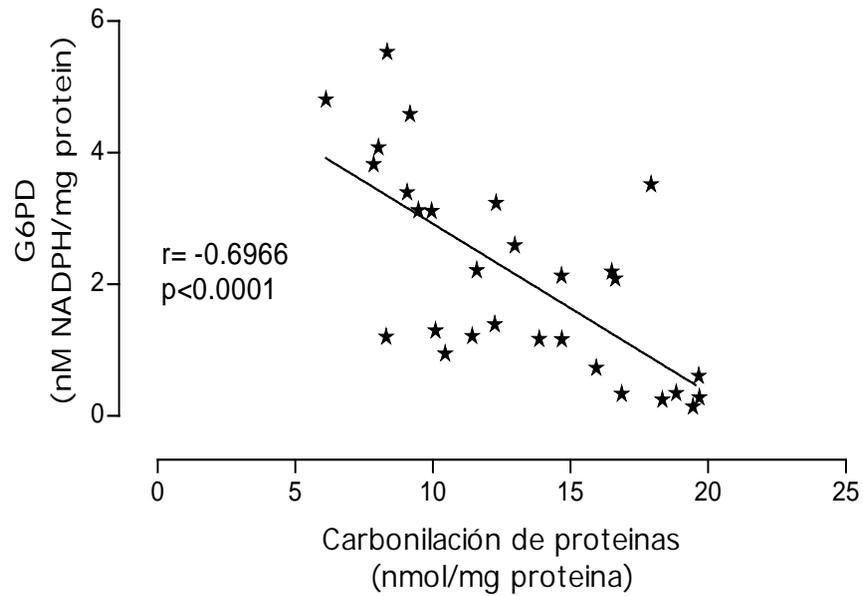
Gráfica 20. Determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

La gráfica 21 representa la concentración de los grupos SH no proteicos, determinados en el citosol de los eritrocitos obtenidos de los voluntarios sanos y de los pacientes con EPOC antes y después de la incubación con  $PM_{2.5}$ , en la cual se observa que no se presentaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los grupos de estudio.



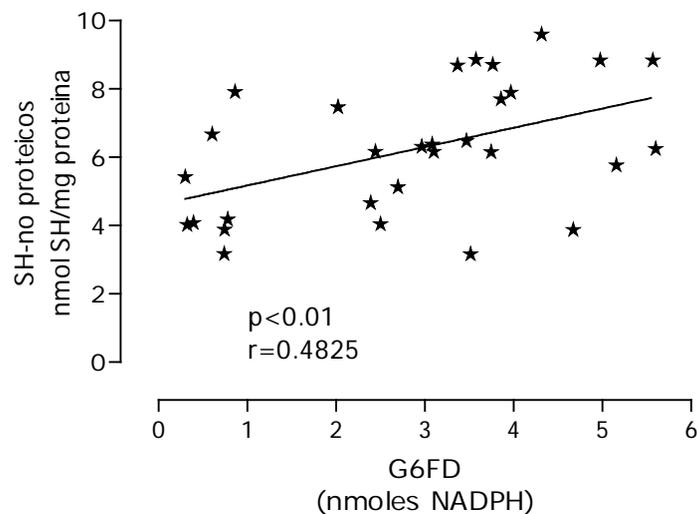
Gráfica 21. Determinación de las concentraciones de sulfidrilos no proteicos en membranas de eritrocitos antes y después de ser expuestos a  $PM_{2.5}$ , en pacientes con EPOC moderada y Severa, así como al grupo control.

La grafica 22 muestra una correlación negativa estadísticamente significativa, entre la concentración de carbonilos, comparada con la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0.6966$ ), esta enzima cuantificada en el citosol, es la encargada de proveer del agente reductor, indispensable en el eritrocito para que sus sistemas antioxidantes realicen su función eficientemente.



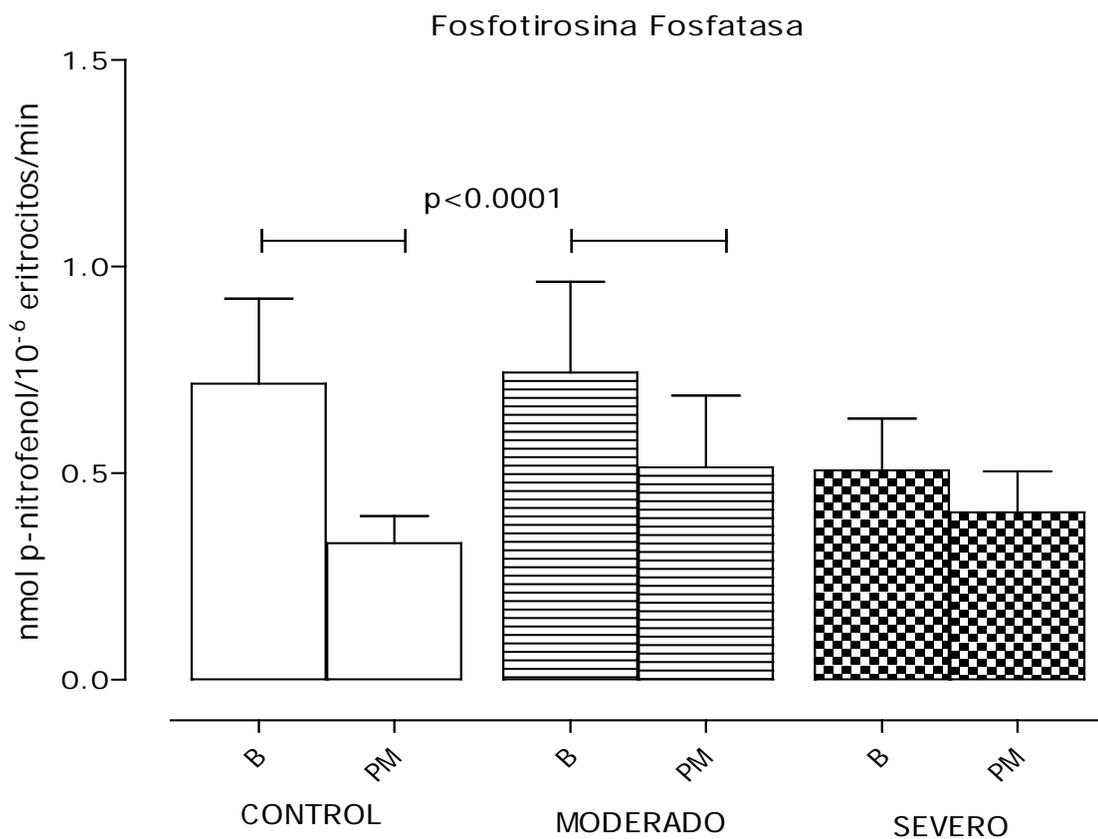
Gráfica 22. Correlación negativa entre la carbonilación de proteínas y la actividad enzimática de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

cuándo fueron evaluados los SH-no proteicos en los diferentes grupos de estudio, no presentaron diferencias estadísticas significativas, a pesar de esta situación al hacer el análisis de correlación de este parámetro con la actividad enzimática de G6FD se presentó una correlación estadísticamente significativa  $p < 0.01$ , con un valor de  $r = 0.4825$  (Gráfica 23).



Gráfica 23. Correlación positiva entre la concentración de SH no proteicos y de la actividad enzimática de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

En la gráfica 24 se muestra la actividad de la fosfotirosina fosfatasa, la cual presenta una disminución significativa en el grupo control y en los pacientes con EPOC moderada, cuando los eritrocitos son expuestos a las PM. La inhibición fue mayor en el grupo control  $p < 0.0001$ , aproximadamente en un 53.52%, comparada con su estado basal ( $0,71 \pm 0,2$  a  $0,33 \pm 0,06$  nmol p-nitrophenol/ $10^6$  eritrocitos / min).



Gráfica 24. Actividad enzimática de la Fosfotirosina Fosfatasa en membranas de eritrocitos de pacientes con EPOC (moderado y severo), antes y después de ser expuestos a las PM<sub>2.5</sub>.

## 8. DISCUSIÓN

El organismo necesita oxígeno para que las células puedan ejercer su función respiratoria y generar ATP, por lo que una oxigenación deficiente provoca hipoxia tisular y alteraciones funcionales en las células. Esta condición ocurre en ciertas patologías respiratorias como la EPOC. Los pacientes con EPOC presentan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno originadas en diferentes tejidos. La generación de moléculas reactivas es concomitante a la disminución en la eficiencia de los sistemas antioxidantes, dando lugar a una situación metabólica que propicia un desequilibrio en la homeostasis óxido-reductora denominado estrés oxidativo. Como consecuencia del estrés oxidativo se presentan modificaciones estructurales y funcionales en células y tejidos., incluyendo a los eritrocitos, en los que hay una disminución de su capacidad para transportar y difundir oxígeno hacia los tejidos <sup>(Decramer et al., 2005)</sup>, ya que la hemoglobina presenta menor capacidad de oxigenación como consecuencia de la oxidación del hierro al estado férrico (metahemoglobina). El eritrocito necesita mantener la integridad de su membrana, sustentada en la función catalítica de las proteínas que conforman la denominada banda 3, que constituye el mayor agregado de proteínas embebido en su membrana y que, dada su estructura, también es susceptible de ser afectada por el estrés oxidativo presente en la EPOC.

Los resultados mostrados en el presente trabajo muestran un incremento de Dienes conjugados y de lipohidroperóxidos durante la progresión de la EPOC. Así mismo se determinó la eficacia antioxidante de paraoxonasa (actividad arilesterasa) la cual se encuentra asociada a la Apo A<sub>1</sub> de las HDL <sup>(Aviram y col, 1998)</sup>, esta fue cuantificada por su actividad y por la relación en la formación de Lipohidroperóxidos (LPH).

En un intento por comprender el origen y las consecuencias del daño oxidativo, en la membrana del eritrocito durante la progresión de la EPOC, fueron cuantificados diversos biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo (Gráfica 5-7). Nuestros datos indican claramente que los biomarcadores presentan un aumento estadísticamente significativo, conforme al desarrollo de la EPOC. Las características del estrés oxidativo crónico fueron

similares a lo publicado anteriormente por nuestro grupo <sup>(Torres-Ramos et al., 2009)</sup> (Gráfica 5-7). A pesar de que la concentración en los eritrocitos de pacientes con EPOC presentaron cierta similitud a el grupo control (Tabla 4), el daño oxidativo a las membranas de eritrocitos fue mayor en los pacientes con EPOC. Esto se debió probablemente a una disminución en la actividad enzimática de la Fosfotirosina Fosfatasa, consecuencia del estrés oxidativo presente en la EPOC, la cual se encuentra relacionada con la disfunción de las proteínas banda 3, ocasionando la alteración en la extrusión del  $\text{HCO}_3^-$  <sup>(Straface et al., 2000)</sup>.

La banda 3 constituye el elemento central de un macrocomplejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito. Esta proteína multifuncional tiene tres dominios: un dominio de membrana transversal donde ocurre el intercambio bicarbonato/cloruro ( $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ), un dominio citoplasmático corto C-terminal, y un dominio citoplasmático largo N-terminal.<sup>11</sup> El dominio C-terminal citoplasmático de la banda 3 une la anhidrasa carbónica II (CA II), formando un complejo metabólico que permite el paso de bicarbonato en la fase citoplásmica de la banda 3. El dominio citoplásmico N-terminal de la banda 3 une a diversas enzimas glucolíticas, hemoglobina (Hb) y hemicrones, que pueden inducir la agregación de la banda 3 y el recambio celular.<sup>13</sup> Una función fundamental del dominio N-terminal de la banda 3, es el anclaje de la membrana eritrocitaria al citoesqueleto subyacente. El citoesqueleto del eritrocito es muy importante ya que le proporciona su forma bicóncava permitiéndole soportar las grandes tensiones mecánicas a las que se ve sometido durante su paso por los finos capilares. De hecho, existen alteraciones en las proteínas que conforman el citoesqueleto que conllevan a la formación de eritrocitos con formas anormales. Estos eritrocitos anómalos son más propensos a fragmentarse originando cuadros de anemia hemolítica.<sup>(Bosman y col, 1990)</sup>

De ahí la importancia que el eritrocito mantenga la integridad en sus sistemas antioxidantes y en su membrana, y así poder cumplir eficientemente con sus funciones vitales como es el transportar al  $\text{O}_2$ . Y una forma de poder evaluar a la banda 3 es mediante la cuantificación de la actividad de la fosfotirosina Fosfatasa. En el presente trabajo se observó que la FTF (Gráfica 15) en los eritrocitos de los pacientes con EPOC muestran una disminución significativa (43%) de la actividad en las etapas III y IV de la enfermedad, estos datos sugieren que los eritrocitos de los pacientes tuvieron una alteración en la capacidad para llevar a cabo eficientemente la extrusión del  $\text{HCO}_3^-$ , algo similar demostraron Matarrase y col en 2005, sus resultados presentaron una disminución de la actividad de la FTF, cuando los eritrocitos son expuestos a peroxinitrito, donde demuestran que la fosforilación de la Banda 3, puede ser inducida por la inhibición de la FTF.

El evidente aumento de los marcadores de daño oxidativo en el plasma (Gráfica 5-7) y su relación con la progresión de la EPOC (Tabla 4) sugiere que los glóbulos rojos bajo un ambiente oxidativo, pueden ser capaces de dañar a las membranas (Gráfica 11-14). Estos eritrocitos dañados demuestran una alteración metabólica, originando un aumento en la glucólisis, lo que provocó una reacción exagerada en las vías de las pentosas (Campanella et al., 2005) El aumento de la glucólisis también condujo a un aumento en la disponibilidad de de la glucosa-6-fosfato para generar suficiente NADPH y H<sup>+</sup>, y así aumentar la capacidad antioxidante y prevenir la lisis celular.

La Apo-A y las concentraciones de HDL no fueron estadísticamente diferentes entre los pacientes con EPOC y el grupo control (Tabla 5). Sin embargo, la actividad de paraoxonasa (PON) la cual se encuentra asociada en la Apo-A de las moléculas de la HDL, presentó diferencias estadísticas en todos los grupos de pacientes con EPOC, comparadas con el grupo control cuando la Paraoxonasa fue expresada por mg de HDL (Gráfica 8B), sin embargo cuando Paraoxonasa se expresa por mg de APO-A, solo se encontró diferencias en el GOLD II, III y IV, (Gráfica 8C). El mecanismo exacto por el cual la PON ejerce su efecto protector no está bien establecido, aunque se ha propuesto que este efecto antioxidante se puede asociar con la actividad de peroxidasa que presente la PON (Jaouad et al., 2003) La hidrólisis de peróxidos lipídicos es un paso esencial en el proceso de lipoperoxidación que concluye con el rompimiento de ácidos grasos insaturados, para finalmente producir varios aldehídos (Medina-Navarro et al., 2007) La disminución progresiva de la actividad de PON en los pacientes con EPOC se encontró asociada al aumento de carbonilos de plasma (que muestra el daño a las proteínas plasmáticas) (Gráfica 7), y un aumento de los lipohidroperóxidos (LPH) (Gráfica 5). El mecanismo de inactivación de PON podría ser causada por la formación de aductos y la modificación de varias proteínas, incluyendo la Apo-B-100 de la LDL y la insulina (Jaouad et al., 2003) En los resultados obtenidos se observa, una disminución en la actividad de PON, en condiciones oxidativas lo que permitió el desarrollo de la lipoperoxidación en plasma, células y tejidos. La actividad de PON disminuyó durante los estadios GOLD II a GOLD IV, la lesión de la membrana de los eritrocitos, fue observado por un aumento en la generación de dienos conjugados y LPH (Gráfica 11 y 12). Sin embargo, el MDA en las membranas, solamente se presenta diferencia estadística en el GOLD I, no mostró diferencias en los demás grupos, que es tal vez debido a la formación de aductos con proteínas de membrana como la FTF de la banda 3. Los eritrocitos suelen tener mecanismos eficientes de defensa antioxidante debido a que su función fisiológica depende de la integridad de la membrana. La inhibición de la FTF se encuentra en las etapas III y IV

de la EPOC, esto podría estar relacionado con el deterioro del paciente debido a la progresión de la enfermedad. Esto puede resultar en una pobre oxigenación de los tejidos, dando lugar a efectos secundarios característicos de la EPOC: <sup>(Li et al., 2008)</sup> pérdida de peso, alteraciones nutricionales, la disfunción del músculo esquelético, un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, y varios efectos neurológicos y esqueléticos y al deficiente intercambio de aniones causado por la oxidación de la membrana. Los eritrocitos de estos pacientes pueden alterar funciones de la banda 3 para sobrevivir al incremento de la utilización de glucosa y a la disminución en el intercambio de aniones.

Hemos demostrado que los aldehídos reactivos, incluyendo al MDA se generan como subproducto de la actividad de ERO durante el estrés oxidativo presente en los pacientes con EPOC. Estos productos son capaces de formar aductos con las proteínas de la membrana de los eritrocitos, lo que origina una disminución en la cuantificación de MDA en membranas. Sin embargo, los pasos previos de la lipoperoxidación, dienos conjugados y LPH se incrementaron progresivamente en las diferentes etapas de la EPOC, mostrando las siguientes características: (1) una disminución de la actividad de la fosfotirosina fosfatasa, (2) una correlación inversa causada por la disminución en plasma de la actividad de PON y un aumento en la concentración de LPH y en la carbonilación de proteínas, (3) no hay evidencia de una correlación entre la disminución de la actividad de FTF y de la carbonilación en membranas de eritrocito (Gráfica 14) y (4) un aumento en la tendencia de daño oxidativo correlacionado con la progresión de la enfermedad. También se examinó si el daño oxidativo producido en la membrana induce una disminución en la actividad FTF, lo cual podría disminuir la actividad de la banda 3, e interferir en la extrusión de bicarbonato y por lo tanto en la eliminación de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, la inhibición de la FTF, con un aumento en la glucólisis en los eritrocitos <sup>(Marieta et al., 1991)</sup> y la disponibilidad de la glucosa-6-fosfato para la reducción de NADP<sup>+</sup> en la catálisis de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa <sup>(Bordin et al., 2005)</sup>. Esto, a su vez, produce NADPH y H<sup>+</sup>, lo que impide la lisis de glóbulos rojos en pacientes con EPOC.

Con lo expuesto anteriormente, se reitera que los pacientes con EPOC, representan una población susceptible, y que la protección de la salud en su entorno es un reto, mas aun, cuando son residentes en áreas con una pobre calidad de aire. La exposición a partículas en suspensión se asocia con enfermedades a corto y largo plazo, como lo es la EPOC. La exposición a corto plazo a las partículas (PM) se asocia con la mortalidad cardiovascular en los adultos <sup>(Medina-Navarro et al., 1997)</sup>. La exposición a corto plazo también se asocia significativamente, aunque con menos fuerza, con un exceso de visitas a urgencias e

ingresos hospitalarios debido a los síntomas cardiovasculares y respiratorias (Hackley et al, 2007). Este fenómeno clínico no se observa en las poblaciones que se han adaptado a la contaminación atmosférica debido a su capacidad para la inducción eficiente de enzimas antioxidantes, la cuales se han incrementado después de años de exposición a los contaminantes (Hicks et al, 1996). La exposición a largo plazo parece aumentar el riesgo de desarrollar bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer de pulmón. Los efectos acumulativos de la exposición crónica a PM se han estimado para reducir la esperanza de vida de la población de EE.UU. en 1,3 años (Dejmek et al, 2000).

La EPOC afecta la estructura y la función pulmonar. Sin embargo, los mecanismos que inducen el aumento de la susceptibilidad de los pacientes con EPOC a la contaminación atmosférica y las partículas aún no han sido identificados. En este estudio, hemos demostrado *in vitro*, las diferencias en la respuesta de los eritrocitos de voluntarios sanos en comparación con los eritrocitos de los pacientes con EPOC, antes y después de ser incubados con PM, provenientes de la Ciudad de México.

Como se menciona anteriormente, un aumento del estrés oxidativo en los eritrocitos, ha sido reportado en muchas condiciones patológicas, incluyendo la EPOC (Torres-Ramos et al, 2009). Por lo tanto, la disminución de la actividad FTF se considera un excelente indicador de daño oxidativo (Zipser et al., 1996).

Nuestros resultados indican que el daño oxidativo de los eritrocitos de los pacientes con EPOC se incrementa en presencia de PM, las cuales pueden generar ERO por mecanismos diferentes según la composición de las partículas (Tabla 6). La generación de EROS en parte puede ser resultado de ciclos redox de sustancias hidrofóbicas, incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que por lo general están vinculados a las partículas finas (Dejmek et al., 2000) de los agregados de hollín (Figura 11 y Figura 12). Estos datos indican la importancia de los mecanismos de participación de ciclo redox de quinonas y reacciones de tipo Fenton por metales de transición en la generación de ERO (Ortega et al., 1999). La Tabla 6 muestra la concentración de metales de transición Fe y Cu distribuidos principalmente en partículas esféricas e irregulares. En nuestros ensayos, estas partículas inducen el daño *in vitro* en las membranas de eritrocitos, reflejado en el aumento de dienos conjugados y la formación de LPH (Figura 16, Figura 17). La generación de ERO por las PM puede ser debido al hierro y cobre, produciendo una reacción de Fenton (Ortega et al., 1999) en fluidos biológicos. Los compuestos aromáticos presentes en el agregado de hollín (Tabla 6) también pueden contribuir a la generación de radicales libres en nuestros experimentos. Sin embargo, esta posibilidad de un medio hidrófobo es necesario generar las condiciones adecuadas para

la generación de EROS. La reacción de Fentón utilizada como control de lesión de la membrana de eritrocitos mostraron niveles similares de daño oxidativo comparadas con el daño producido por las PM. Los descensos observados tanto en la concentración de los grupos SH no proteicos y la actividad de G6PD (Gráfica 20) fueron magnificados por la adición de las PM, se presenta una correlación inversa significativa (Gráfica 22,  $r = 0.6966$ ), entre la actividad de G6PD y la carbonilación de proteínas. La G6PD es una enzima intracelular que desempeña un papel clave en la protección de los eritrocitos frente al estrés oxidativo. Una reducción en la actividad de G6PD, origina cierta susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis. La disminución de NADPH y la no disponibilidad de los grupos SH-no proteicos (Gráfica 21) en los eritrocitos, trae como consecuencia una reducción en la capacidad antioxidante y una deficiencia en la reparación de la membrana celular.

## **9. CONCLUSIÓN**

La interpretación de los resultados en estudios previos realizados "in vitro", presentan una gran dificultad debido a que las partículas utilizadas presentan composiciones químicas diferentes, células diana, parámetros bioquímicos y condiciones experimentales por mencionar algunas. En particular se debe tomar en cuenta el omitir "dosis altas, ya que debe considerarse cual es el nivel de exposición pertinente. Los efectos adversos para la salud de las PM están mediados por las partículas carbonosas y por su composición química. La evidencia experimental ha demostrado que la PM contiene metales de transición, los cuales pueden activar reacciones redox.

Hemos demostrado, que los eritrocitos de una población susceptible a la contaminación del aire son más vulnerables que los eritrocitos de voluntarios sanos debido posiblemente a la falta de NADPH y a la disminución en los grupos SH-no proteicos, lo cual origina que no se lleve a cabo de manera eficiente la actividad antioxidante. El daño oxidativo a los lípidos de membrana y a las proteínas también se demostró concomitante a la disminución de la actividad de FTF y a la alteración de la función del intercambiador aniónico (AE1). Por último, es posible aseverar que las células con lesiones preexistentes como resultado de enfermedades crónicas (EPOC) mostraron una mayor probabilidad de aumentar el daño inicial con la presencia de partículas contaminantes, en comparación con la susceptibilidad de las células de los voluntarios sanos. Este es uno de los primeros proyectos para

demostrar las diferencias en las respuestas de las poblaciones saludables y susceptibles a la contaminación.

## **10. PERSPECTIVAS**

Se considera relevante confirmar lo descrito, mediante la cuantificación de enzimas antioxidantes, glutatión dependientes, para demostrar si existe una activación enzimática antioxidante en el eritrocito dañado que permita explicar la ausencia en el rompimiento membranal (hemólisis) asegurando el aporte aunque disminuido de oxígeno, lo que facilita la sobrevivencia del organismo aun en condiciones de agresión.

Además de analizar con más detalle las condiciones de los sistemas antioxidantes y tratar de apoyar estas investigaciones con la administración de antioxidantes en la dieta de los pacientes como posible terapéutica, lo que mejoraría sustancialmente la calidad de vida de los pacientes que padecen EPOC.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Albert VV, Jason PE, Barry H, Carroll EC. Formation of reactive nitrogen species
- Alvar Agusti, Bartolome Celli. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Masson 2005.
- Amici A, Levine RL, Stadtman ER. Conversion of amino acids residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. *J Biol Chem.* 264:3341-3346, 1989.
- Aviram M, Rosenblat M, Charles LB, Roger SN, Sergio L, Bert N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves. *J Clin Invest* 101(8):1581-1590, 1998.
- Babior B. M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109:33-44, 2000.
- Babior B.M, Lambeth, J.D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-344, 2002.
- Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22(2):111-180, 1987.
- Bartosz G, Gaczynska M, Grzelinska E, Soszynski M, Michalak W, Gondko R. Aged erythrocytes exhibit decreased anion exchange. *Mech Ageing Dev* 39:245-50, 1987.
- Bathoorn E, Liesker JJ, Postma DS, Koëter GH, van der Toorn M, van der Heide S, Ross HA, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 4(1):101-9, 2009.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferenick M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65(18-19):1865-1874, 1999.
- Bosman G. Erythrocyte aging in sickle cell disease. *Cell Mol Biol* 50:81-86. 2004.

Bosman GJCGM, Kay MMB. Erythrocyte aging: A comparison of model systems for simulating cellular aging in vivo. *Blood Cells* 14:19-35, 1988.

Bosman GJCGM,, Kay MMB. Alterations of band 3 transport protein by cellular aging and disease: Erythrocyte band 3 and glucose transporter share a functional relationship. *Biochem Cell Biol* 68:1419-1427, 1990.

Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 5(9):2274-2279, 1991.

Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. Nitric oxide enhances MPP, inhibition of complex I. *FEBS Lett* 504:50-52, 2001.

Cohen MS, Bradley E, Britigan D, Hasselt J, Rosen GM. Phagocytes, O<sub>2</sub> reduction, and hydroxyl radical. *Rev Infec Dis* 10(6):1088-1096, 1988.

Dalle-Done I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1-2):23-38, 2003.

Decramer M, benedotto F, Del Ponte A, and Marinari S. Systemic effects of COPD. *Respir Med*;99(suppl 2): S3-S10, 2005.

Dejmek J., I. Solansky, I. Benes, J. Lenícek, R. J. Sram. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environmental Health perspectives* 108(12), 1159-1164, 2000.

Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes. *Diabetes* 51:1118-1124, 2002.

Di Stefano A, Caramori G, Capelli A y cols.. Increased expression of NF-κB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J.* 20:556-563.74, 2002.

during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem* 272(12):7617-7625, 1997.

El Saadani, H Esterbauer, M El-Sayed, M-Galter. A.Y Nassar and G.Jurgens. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *M. Journal of lipid Research* 30: 627-630. 1989.

Ferreti G, Bachhetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 138(4):163-169, 2001.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Armes B. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-nonenal: formation of cross-linked protein which inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269(34):21639-21643, 1990.

Franssen FM, O'Donnell DE, Goossens GH, Blaak EE, Schols AM. Obesity and the lung: 5. Obesity and COPD. *Thorax* 63(12):1110-7, 2008.

Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiology conditions. *Nature* 391:169-173, 1998.

Guyton-Hall. Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, sistema monocito-macrófago e inflamación. En *Tratado de Fisiología Médica*, décima edición. Ed. *McGraw-Hill*, pp 477-487. 2001

Hackley B, A Feinstein, J Dixon, Air Pollution: Impact on Maternal and Perinatal Health. *Journal Of Midwifery & Women's Health* 52, 435-443, 2007.

Haider T, Casucci G, Linser T, Faulhaber M, Gatterer H, Ott G, Linser A, Ehrenbourg I, Tkatchouk E, Burtscher M, Bernardi L. Interval hypoxic training improves autonomic cardiovascular and respiratory control in patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *J Hypertens*. Apr 20, 2009.

Hashimoto M, Takamiya S, Yokota T, Nakajima Y, Yamakura F, Sugio S, Aoki T. Ascaris suum cytochrome b5, an adult-specific secretory protein reducing oxygen-avid ferric hemoglobin 1(1):42-9, 2008.

Havenga MJ, Bosman GJ, Appelhans H, De Grip WJ. Expression of the anion exchanger (AE) gene family in human brain. Identification of a new AE protein: AEO. *Mol Brain Res* 25:97-104, 1994.

Hebbel RP. Auto-oxidation and a membrane-associated "Fenton reagent": A possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. *Clin Haematol* 14:129-140, 1985.

Hicks J.J, R. Medina-Navarro, A. M. Guzmán-Grenfell, N. Wachter, A. Lifshitz. Possible Effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and Serum lipoperoxides in the Human Adult. *Arch Med Research* 27(2), 145-149, 1996.

Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 185:260-263, 1992.

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Resp Cell Mol Biol* 4(3):278-286, 1991.

Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9(1):16-22, 2009.

Hopkinson NS, Tennant RC, Dayer MJ, et al. A prospective study of decline in fat free mass and skeletal muscle strength in chronic obstructive disease. *Respir Res* 13: 8-25, 2007.

Jacobasch G, Rapoport SM. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Mol Aspects Med.* 17(2):143-70, 1996.

Jacobasch G. Biochemical and genetic basis of red cell enzyme deficiencies. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13(1):1-20, 2000.

Janssen YM, Van HB, Borm PJA, Mossman Bt . *Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage.* *Lab Invest* 69(3):261-274, 1993.

Janvier D, Sellami F, Missud F, Fenneteau O, Vilmer E, Cartron J, et al. Severe autoimmune hemolytic anemia caused by a warm IgA autoantibody directed against the third loop of band 3 (RBC anion-exchange protein 1). *Transfusion* 42:1547-1552, 2002

John D, Bauer MD. Chapter 10 Methods in enzymology in: *Clinical Laboratory Methods.* The C.V Mosby Company, Saint Louis pp.498, 1974.

Joppa P, Petrásova D, Stancák B, Dorková Z, Tkáčová R. Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Wien Klin Wochenschr*; 119: 428-34, 2007.

Juan José Hicks G. *Bioquímica.* Mc Graw Hill, 2006.

Kay MM, Hughes J, Zagon I, Lin FB. Brain membrane protein band 3 performs the same function as erythrocyte band 3. *Proc Natl Acad Sci USA*;88:2778-2782, 1991.

Kay MMB. Contribution of band 3 and its genetic polymorphisms and variants to health and disease. En: *Human blood cells-consequences of genetic polymorphisms and variation.* King MJ, ed., London : Imperial College Press;. p.193-228, 2000.

Kharitonov SA, Barnes PJ.. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:1693-1772, 2001.

Koopman WH. The Haber Weiss cycle 70 years later. *Redox Report* 6(4):229-234, 2001.

Krinski BS, Yu BP. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2):248-254, 1992.

Lai N, Zhou H, Saidel GM, Wolf M, McCully K, Gladden LB, Cabrera ME. Modeling oxygenation in venous blood and skeletal muscle in response to exercise using near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol* (6):1858-1874, 2009.

Lowry OH, rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1950

Luczaj W and Shrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mor Biol Lett* 8(2):391-413, 2003.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76, 1996.

Macnee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 429:195-207, 2001.

Maddipati KR, Marnett LJ, Characterization of de major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem* 262(36):17398-17403, 1987.

Maneva A, Taleva B. Effect of some flavonic compounds and ascorbic acid on lactoferrin stimulation of erythrocyte glycolysis and Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-atpase activity. *Z Naturforsch C.* 63(9-10):773-779, 2008.

Marklund SL, Holme E, Hellener L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 126(1):41-51, 1982.

Medina-Navarro R, A. Lifshitz, N. Wachter, J. J. Hicks. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch Med Res* 28(2), 205-208, 1997.

Morgan MC, Rashid RM. The Effect of Phototherapy on Neutrophils. *Int Immuno pharmacol* Feb 10, 2009.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 79(2):279-288, 1989.

Olivares Corichi I.M., Guzmán Grenfell A.M., Medina Navarro R. y Hicks, JJ. Especies reactivas del oxígeno (ERO): Bioquímica inorgánica y biomedicina. En JJ Hicks. *Bioquímica* 2da Ed. McGraw-Hill pp-690-708, 2006

Ortega C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of PMSG by oxygen-free radicals, change its structure, affecting the hormonal activity. *Mol Reprod Dev* 52, 264-268, 1999.

Popov M, Li J, Reithmeier R. Transmembrane holding of the human erythrocyte anion exchanger (AE1, band 3) determined by scanning and insertional N-glycosilation mutagenesis. *Biochem J* 339:269-79, 1999.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 532-555, 2007.

Raguso CA, Guinot SL, Janssens JP, Kayser B, Pichard C. Chronic hypoxia: common traits between chronic obstructive pulmonary disease and altitude. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(4):411-7, 2004.

Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 156: 341-357, 1997.

Richard O. Recknagel and A. Glende, Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in enzymology*, vol. 105. 331-335, 1984.

Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rats testis. *J Biol Chem* 267:6142-6146, 1992.

Rutes S, Lindsey AE, Ward CL, Kopito RR. Functional activation of plasma membrane anion exchangers occurs in a pre-Golgi compartment. *Cell Biol* 121:37-48, 1993.

Santiworakul A, Jarungjitaree S, Jalayondeja W, Chantarothorn S, Supaibulpipat S. Effect of lower extremity exercise on muscle strength and physical capacity in COPD patients. *J Med Assoc Thai*. Apr;92(4):556-63, 2009.

Schols AM, Wouters EF. Nutrition abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 21: 753-762, 2000.

Sergutina AV. Cytochemically determined activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in morphochemical characteristics of the brain of wistar rats differing by locomotion parameters. *Bull Exp Biol Med*. 147(1):45-7, 2009.

Sohal RS, Svensson I, Sohal BM, Brunk TU. Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev* 49(2):129-135, 1989.

Steck TL. The band 3 protein of the human red cell membrane: A review. *J Supramol Struct* 8:311-24, 1978.

Sterling D, Reithmeier RAF, Casey JR. A transport metabolon: functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J Biol Chem* 276:47886-4794, 2001.

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284-287, 1983.

Torres Ramos, Y.D, Sierra Vargas, MP., Olivares-Corichi, IM., Hicks, JJ.. Marcadores plasmáticos de estrés oxidante en población mexicana sana de 30-60 años de edad.. *Rev Inst. Nal. Enf. Resp*, 2006.

Torres-Ramos Y. D., M. L. Garcia-Guillen, I. M. Olivares-Corichi, J. J. Hicks. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *The open Respiratory medicine Journal* 3, 61-66 , 2009.

Wang DN, Sarabia VE, Reithmeier RAF, Kuhlbrandt W. Three dimensional map of dimeric membrana domain of the human erythrocyte anion exchanger , band 3. *EMBO J* 13:3230-3235, 1994.

William MacNee MD. Oxidants/antioxidants and COPD. *CHEST* 117:303S-317S, 2000.

Yehudit Zipser and Nechama S. Kosower. Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. *Biochem J* 314:881-887, 1996.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74(1):139-162, 1994.

Zhang D, Kiyatkin A, Bolin JT, Low PS. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood* 96:2925-2933, 2000.

Zipser Y. and N. S. Kosower. Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. *Biochem J* 314, 881-887, 1996.

## Urban PM<sub>2.5</sub> induces ROS generation and RBC damage in COPD patients

Yessica D Torres-Ramos<sup>1,2</sup>, Araceli Montoya-Estrada<sup>1</sup>, Alberto M Guzman-Grenfell<sup>1</sup>, Javier Mancilla-Ramirez<sup>1</sup>, Beatriz Cardenas-Gonzalez<sup>3</sup>, Salvador Blanco-Jimenez<sup>3</sup>, Jose D Sepulveda-Sanchez<sup>3</sup>, Alejandra Ramirez-Venegas<sup>4</sup>, Juan J Hicks<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Nacional de Perinatología. Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER), Mexico, <sup>2</sup>Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico, <sup>3</sup>Dirección de Investigación Experimental en Contaminación Atmosférica, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología, Mexico. <sup>4</sup>Clinica de Tabaquismo, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Ismael Cosío Villegas, Mexico

### TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and methods
  - 3.1. Collection of particulate matter
  - 3.2. Patients
  - 3.3. Treatment strategy
  - 3.4. Stimuli with PM<sub>2.5</sub>
  - 3.5. Hydroxyl (HO) radical generation
  - 3.6. Biochemical analysis
  - 3.7. Statistics
4. Results
  - 4.1. Respiratory probes
  - 4.2. Particle characteristics
  - 4.3 Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>10</sub> free fraction
5. Discussion
6. Conclusion
7. Acknowledgements
8. References

### 1. ABSTRACT

Particulate matters (PM) produce adverse effects on the respiratory system and cause COPD. These effects are thought to involve intrinsic generation of ROS which are present in ambient PM (transition metals and aromatic organic compounds). Here, we examined the chemical composition and ultra-microscopic structure of PM<sub>2.5</sub>. The effect of this PM was studied in red blood cell (RBC) membranes (ghosts) from healthy volunteers (n = 11) and COPD patients (n = 43). These effects were compared with that produced by a Fenton metal-catalytic ROS generator. Oxidative biomarkers and cell damage were significantly increased in presence of PM<sub>2.5</sub> or ROS generator in RBC of COPD patients as compared with those in cells from healthy volunteers. In contrast, total SH groups, band 3 phospho-tyrosine phosphatase (PTPase) and glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PD) activities were all diminished in cells from COPD patients. In conclusion, PM<sub>2.5</sub> increases damage to RBCs from COPD patients, decreases the activity of PTPase and G6PD, and alters the function of the anionic exchanger (AE1) and the antioxidant response by decreasing SH groups.

### 2. INTRODUCTION

According to a census carried out in the 2000, Metropolitan Area of Mexico City with 18 million inhabitants is one of the most densely populated cities in the world (1). This area is an elevated basin, approximately, 2240 meters above sea level. Since 23% less oxygen is available at this level, combustion is less efficient.

There are indications that when sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) concentration is high, new particles are formed. The average atmospheric lifetime of sulfur emitted in Mexico City is 5.5 days, which is longer than the average lifetime of sulfur released in the rest of the world (3.9 days). Because of the altitude and the subtropical latitude of the Mexico City basin, the region receives intense solar radiation that promotes efficient photochemical formation of pollutants. This changes their chemical composition during air transportation and results in particulate materials with different chemical properties.

For example, in the southeast zone of the city (Iztapalapa), the organic fraction of fine particles (PM<sub>2.5</sub>) at the Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (National Center for Environmental Research

## Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub>

and Training, CENICA) site is estimated to represent 54.6% of the total mass, with the remainder being inorganic compounds (mainly ammonium nitrate and sulfate/ammonium salts), black carbon (BC) and soil (2). Air pollution is associated with respiratory and cardiac diseases, particularly in children, women during the first trimester of pregnancy and the elderly. Yet, the mechanism(s) of pollutant-mediated injury remains unknown. The diverse composition of particulate material, may contribute to the range of different results that have been reported (3). However, the prevailing opinion is that molecular mechanisms of pollutant-induced injury might be due to oxidative stress (4). Suspended air particles are potent oxidants, oxidizing important biological molecules either directly in the cellular compartments or indirectly through the activation of intracellular pathways (5). Experimental evidence has shown that the toxicity and carcinogenicity of particulate pollutants are independent of their chemical composition. Pollution toxicity is induced through ROS production in target cells, and the heterogeneity in chemical compounds in ambient particulate matter, including transition metals and aromatic organic compounds, may contribute to adverse effects through ROS (3-4, 6). Acute effects occur at relatively low pollutant concentration and are associated with particles of apparently innocuous composition (largely carbon, ammonium sulfate and nitrate) (5). Ultra-fine particles are contained in the fine fraction, and the soluble material may translocate to extrapulmonary sites for local cellular activation (7-8).

Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), are most susceptible to air pollution. Due to the predicted increase in the prevalence and mortality of COPD in future, a unified, international effort is required to reverse these trends. The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease outlines a simple classification system that divides the disease severity into four stages (9). According to this classification, the following groups are defined: GOLD I-Mild; GOLD II-Moderate; GOLD III-Severe; and GOLD IV-Very severe. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis and progression of COPD (7). Oxidative stress causes structural changes to essential components of the lung, leading to irreversible damage to both the parenchyma and the airway wall. Moreover, the serious imbalance between ROS production and antioxidant defenses leads to the activation of transcription factors (such as nuclear factor NF- $\kappa$ B), inactivation of anti-proteases, increased sequestration of neutrophils in the pulmonary microvasculature, and oxidative tissue and cellular injury (8). ROS are generated, principally, from leukocytes in the blood/air spaces or inhaled in the form of environmental oxidant pollutants, including cigarette smoke, particulate matter, and smoke from wood (3).

An increase oxidative stress in RBC has been reported in many pathological conditions and diseases (10,11). Due to the ability to detect oxidative modifications in cells during the GOLD II stage and after experimental exposure to ROS and reactive nitrogen species (RNS) damage to RBCs has been proposed as a biosensor of

COPD progression. Typically, these RBC modifications are studied by scanning electron microscopy and flow-cytometric analysis. RBCs show a moderate OE response that is characterized by a decrease in functional capacity of ion exchange. Affected exchanges include O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> uptake from the lungs or peripheral tissues, and CO<sub>2</sub> extrusion as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> through the band 3 anion exchanger (12). The band 3 anion exchanger forms a scaffold for the assembly of a protein complex that can transmit extracellular signals and modulate the transport and mechanical properties of the erythrocyte. These altered RBCs have a reduced transport capacity and a reduced peripheral release of O<sub>2</sub> (11).

In this study, we evaluated increases in oxidative damage that are normally observed in various stages of COPD. We incubated RBCs from COPD patients with PM<sub>2.5</sub> or a ROS generator system and measured membrane biomarkers of oxidative injury to assess the acceleration of COPD progression following ROS generation. We also quantified oxidative injury to the RBC membrane. Finally, changes in phospho-regulation between the different GOLD stages were evaluated by measuring the activities of phosphotyrosine phosphatase (PTPase) and glucose-6 phosphate dehydrogenase and relating these changes to RBC function. The results presented here, provide strong evidence that there is an increased vulnerability to oxidative damage in RBC of COPD patients due to the fact that their antioxidant system is compromised.

## 3. MATERIALS AND METHODS

Unless otherwise specified, all reagents used in this study were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

### 3.1. Collection of particulate matter

Respirable particles [aerodynamic diameter < 10  $\mu$ m (PM<sub>10</sub>)] and fine particles [< 2.5  $\mu$ m (PM<sub>2.5</sub>)] were collected at the Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (National Center for Environmental Research and Training, CENICA). Fourteen PM<sub>10</sub> and 13 PM<sub>2.5</sub> samples were obtained simultaneously over a 24-hour period from May 2006 to February 2007. The samples were collected with Andersen-Graseby high volume samplers onto quartz fiber filters (Whatman). The CENICA site is situated in southeast Mexico City (Iztapalapa zone) at the Autonomous Metropolitan University campus. It is the most populated area of the city and is less than 2 km from the most important food merchandise distribution center in the city. The samplers were located on the roof of a four-story building.

Before and after sample collection, the filters were conditioned at 22  $\pm$  3°C and 40  $\pm$  5% RH during a 24-hour period and weighed with an analytical balance (Sartorius, sensitivity 10<sup>-4</sup> g). After weighing, a section of the PM<sub>10</sub> filter was subjected to chemical analysis following the standard procedures of the USA EPA (1996 and 1998) by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Perkin Elmer, 3300 DV) and atomic

**Table 1.** Demographics and lung function characteristics

	HV, n=11	Moderate, n=26	Severe, n=17	SS
Age (yr)	61.00(8.8)	69.95(10)	68.02(7.5)	NS
Sex (F/M)	10/1	9/17	4/13	NS
TS (Pack/yr)	-----	40.5(18)	46(15.5)	NS
BMI	27.6(3)	26.70(4)	26.18(2.5)	NS
FEV <sub>1</sub> p(%)	106 (21.88)	78.55(12)	58.15(6)	<0.0001
FVC p(%)	104.7 (21.07)	103.86(8)	61.33(17)	<0.0001
FEV <sub>1</sub> /FVC	79.0(4)	57.99(8)	36.27(9.5)	<0.0001

The data are the MEAN (SD); TS= Tobacco smoking; BMI=body mass index; FEV<sub>1</sub>=first forced expiratory volume; FVC=forced vital capacity. \*Chi square test. SS: statistical significance

absorption spectroscopy (Varian, Spectra A-2). A sub-sample of the PM<sub>10</sub> filters were analyzed by electron microscopy (JEOL, JSM-5900 LV) coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (Oxford) to determine the size distribution and individual composition of the particles. The complete PM<sub>2.5</sub> filter was swept with a powder puff, with particles collected in a polyethylene vial. The amount of particles recovered using this technique ranged from 18 to 80 mg.

### 3.2. Patients

A total of 43 patients with a diagnosis of COPD and 11 healthy volunteers were enrolled in this study. COPD patients were ex-smokers and belonged to a cohort of subjects who were evaluated during a clinically stable period that was free of exacerbations during the previous six weeks. Subjects had a history of smoking at least 10 packs of tobacco products per year. COPD diagnosis was established according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines with the severity of disease divided into moderate and severe (Table 1) (9). Subjects who met the criteria for COPD but had an alternative respiratory disorder (i.e., bronchiectasis or asthma) were excluded. Spouses of COPD patients who had no history of chronic illness, such as diabetes, rheumatoid arthritis, or lung disease, were recruited as controls. Individuals with a history of tobacco smoking were excluded. The protocol of this study (B10-08) was approved by the Ethics Committee at the National Institute of Respiratory Diseases. All subjects were informed, and their written consents were obtained.

### 3.3. Treatment strategy

Subjects underwent treatment for post-bronchodilator spirometry following the procedures recommended by the ATS and ERS (13). We used Mexican standard reference equations for predicted values (14). For spirometry, we used a dry rolling-seal volume spirometer (Sensormedics, Yorbalinda, CA). Subjects also underwent testing for their blood count and lipid profile.

Blood samples (5 mL) from both healthy volunteers and COPD patients were obtained by venipuncture and centrifuged. The plasma and erythrocyte ghosts were obtained and used for stimulation with particles and the Fenton reaction.

### 3.4. Stimulation with PM<sub>2.5</sub>

The particles were resuspended at a concentration of 1 mg per test in Krebs-Ringer phosphate buffer, pH 7.4.

### 3.5. Hydroxyl (HO) radical generation

Hydroxyl radical generation was obtained via the Fenton reaction (15) using 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 5 mM CuSO<sub>4</sub>. After incubating 5 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 5 mM of citrate.

Following stimulation, open erythrocyte membranes were prepared by hypotonic lysis of RBC cells obtained from whole blood, as originally described by Steck, and subsequently used for biomarker analysis (16).

### 3.6. Biochemical analysis

To evaluate lipoperoxidation, 1-methyl-2-phenylindole (Sigma-Aldrich, MO) was used as standard. Aliquots of plasma were used to measure malondialdehyde (MDA) at 586 nm, and the values obtained were expressed as nmol of MDA per mg of dry weight (dw) (17). To evaluate lipid peroxides, we used the assay conditions described by Yagi *et al.* (18). The test solution was mixed with a color reagent of a commercially available kit for the enzymatic determination of cholesterol (CHO-iodide; Roche). This assay quantifies lipid peroxides by testing their ability to convert iodide to iodine, which can be measured photometrically at 365 nm. Calibration curves were obtained using peroxides, such as t-butylhydroperoxide. The concentration of lipid peroxides was calculated using the molar absorptivity of I<sub>3</sub> measured at 365 nm ( $\epsilon = 2.46 \pm 0.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The conjugated dienes were obtained after a single extraction with methanol-chloroform and quantified using a molar extinction coefficient of  $28 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and photometric analysis at 284 nm (19).

Protein damage was evaluated by determining the carbonyl group content of the erythrocyte membranes using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), which reacts with the protein carbonyl derivatives to form stable hydrazones that absorb at 370 nm (20). A molar extinction coefficient of  $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was used to quantify carbonyl content. PTPase activity was determined using p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) as a substrate according to previously published procedures (21). The release of p-nitrophenol from p-NPP was measured spectroscopically at 410 nm. Protein sulfhydryl groups were evaluated using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), with the absorbance measured at 412 nm (22). Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity was measured as the absorbance at 340 nm, as previously described (23).

## Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub>

**Table 2.** Scanning electron microscopy classification of morphology and elemental composition in individual PM<sub>2.5</sub> particles

Element	Spherical n=20			Cluster n=27			Irregular n=70			Soot Aggregate n=38		
	Min	Max	n	Min	Max	n	Min	Max	n	Min	Max	n
<b>C</b>	12.97	60.23	20	20.63	58.73	27	18.81	60.8	70	23.08	53.98	38
<b>O</b>	27.19	45.38	20	28.91	44.33	27	25.17	53.52	70	21.51	41.89	38
<b>Na</b>	0.35	0.94	7	0.31	11.27	15	0.31	3.32	38	0.32	1.61	15
<b>Mg</b>	0.23	8.91	9	0.31	6.69	10	0.34	13.02	33	0.25	1.22	7
<b>Al</b>	0.43	9.6	10	0.47	7.31	22	0.65	17.91	52	0.37	3.77	11
<b>Si</b>	6.86	28.27	20	5.07	29.54	27	3.65	51	69	8.11	44.93	38
<b>P</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>S</b>	nd	nd		nd	nd		0.51	1.87	3	nd	nd	
<b>Cl</b>	0.09	2.56	3	0.35	3.15	4	0.25	7.72	9	nd	nd	
<b>K</b>	0.31	4.26	11	0.31	4.91	15	0.16	7.21	50	0.24	4.55	18
<b>Ca</b>	0.31	3.28	17	0.28	10.23	22	0.23	21.87	63	0.22	2.88	22
<b>Ti</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>V</b>	0.29	1.08	2	nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Cr</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Mn</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
<b>Fe</b>	0.56	50.57	8	0.37	6.19	14	0.38	32.76	43	0.38	0.92	5
<b>Cu</b>	0.47	1	4	nd	nd		0.66	1.63	7	0.52	1.54	4
<b>Zn</b>	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	

nd=not determined

### 3.7. Statistics

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. One-way ANOVA and Bonferroni's Multiple Comparison Test, linear regression, and Pearson's correlation were used for statistical analysis. Differences were considered significant when the p-value was  $<0.05$ . Data analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (version 10.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL).

## 4. RESULTS

### 4.1. Respiratory probes

This study included a total of 26 patients as follows: Moderate group: [7 patients (16.2%) in GOLD stage I, 19 patients (44.1%) in GOLD stage II] and 17 patients in the "severe" group [10 patients (23.2%) in GOLD stage III and 7 (6.2%) in GOLD stage IV]. The only difference between GOLD stage groups was in the spirometry parameters, as calculated using ANOVA analysis (Table 1). There were significant differences between the control and patient groups with respect to post-bronchodilator FEV<sub>1</sub> percent predicted, forced vital capacity (FVC) percent predicted, and the FEV<sub>1</sub>/FVC ratio (Table 1). There were no significant differences between the two groups with respect to age and body mass index (BMI). The mean cumulative tobacco consumption for COPD patients was  $46 \pm 26$  pack-years. COPD patients had statistically higher hematocrit values in the blood count.

### 4.2 Particle Characteristics

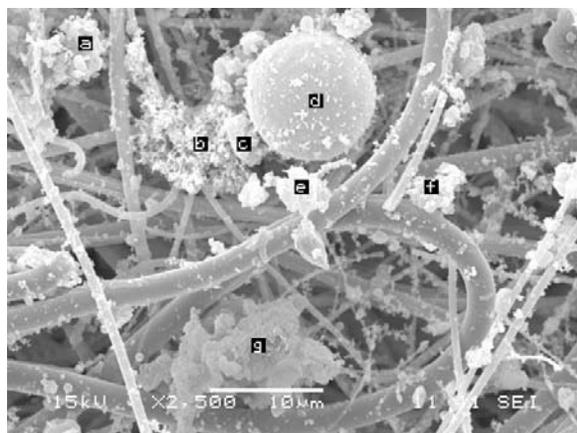
We utilized a mixture of particles from industrial sources. From the nearly 100 filters that were evaluated, two PM morphologies were most frequent. Representative scanning electron microscopy images are shown in Figures 1 and 2. The morphological form classification and elemental composition in the fine fraction ( $< 2.5 \mu\text{m}$ )

particles measured at the CENICA site are shown in Table 2. Figures 1 and 2 illustrate the diverse forms observed in the ultra-microscopic analysis. Different morphological forms have a characteristic composition that can be correlated with the emission source. The predominant forms were spherical (n = 20), clusters (n = 27), irregular (n = 70) and aggregate or reticular forms of soot aggregates (n = 38). Table 2 displays the individual X-ray fluorescence analysis that correspond to Figures 1 and 2. The quantitative analyses indicate that carbon and oxygen, likely derived from incomplete combustion of fossil fuels, were the principal components. These elements accounted for 68% to 94% of the coarse fraction and 74% to 76% of the fine fraction. Metallic elements contributed to 2.5% of the coarse and 2% of the fine fractions. Iron was most abundant in spherical particles (0.56% to 50.57%) and copper in the soot aggregates and irregular particles ( $> 1.5\%$ ). Aluminum, calcium and potassium were also identified and detected principally in irregular particles, while zinc was not found in the samples. The particle size and shape are related to the original source of generation. For example, the soot aggregate which principally accounted for the nanoparticles ( $< 0.25$ ) is generated by vehicular emissions.

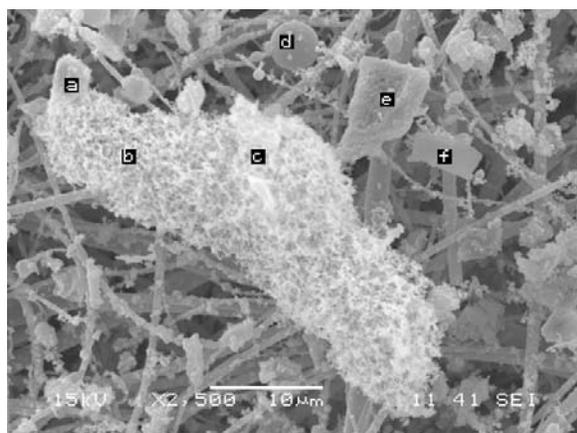
### 4.3. Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub> free fraction.

Figure 3 shows the lipoperoxidative changes in RBC membranes obtained from COPD patients. When compared with HV values, it is apparent that the degree of oxidative injury correlates with progression of the disease. Following incubation with PM<sub>2.5</sub>, diene conjugate formation increased 17.5% (moderate COPD patients) and 16.6% (severe COPD patients) (Figure 3-A) compared with untreated membranes. The LHP values were also increased after PM<sub>2.5</sub> incubation, indicating that pre-existing oxidative injury in COPD patients was exacerbated (Figure 3B). LHP formation was also increased in the treated control group

## Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub>



**Figure 1.** Respirable particles sampled from southeast of Mexico City. Letters a, c and g correspond to PM<sub>10</sub> aggregates; e and f are PM<sub>2.5</sub> fragments; d is a PM<sub>10</sub> sphere and b corresponds to carbon reticular non particles. The most abundant elemental components in these particles are carbon, oxygen, silicon, potassium, calcium and iron.



**Figure 2.** Respirable particles sampled from southeast of Mexico City. Letters a, c and e correspond to PM<sub>2.5</sub> fragments; f is PM<sub>10</sub> fragment; d is a combustion PM<sub>10</sub> sphere and b is a reticular carbon particle that is part of a nanoparticle network.

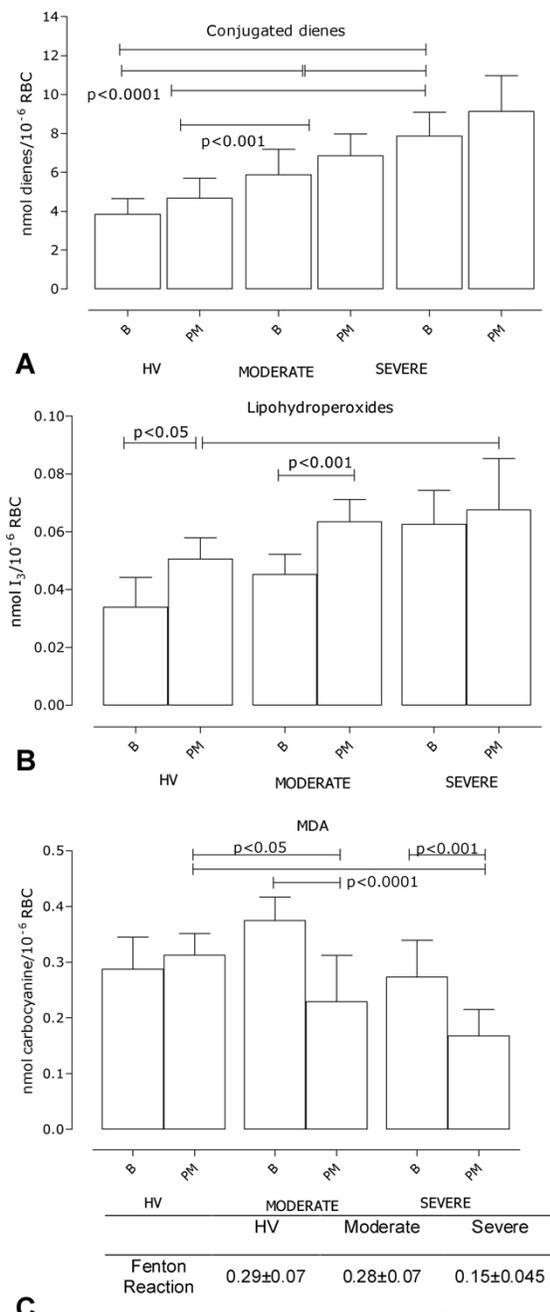
( $0.03 \pm 0.01$  to  $0.05 \pm 0.007$  mmol I<sub>3</sub>/10<sup>6</sup> RBC) but never reached the levels obtained from patients in moderate or severe stage of COPD ( $0.06 \pm 0.007$  to  $0.067 \pm 0.017$ ). The MDA concentration significantly decreased in both COPD stages ( $P < 0.001$ ) (Figure 3C) when compared with the control group, which did not show a significant decrease in MDA after PM<sub>2.5</sub> incubation ( $0.28 \pm 0.05$  to  $0.31 \pm 0.04$ , nmol of carbocyanine/mg dw). Figure 3C (lower panel) shows the Fenton reaction values, which are similar to those obtained after PM incubation. Figure 4A shows the amount of free protein carbonyls. Significant increases ( $p < 0.001$ ) were observed in both the moderate ( $14.3 \pm 2.9$  to  $21.29 \pm 5.1$  nmol) and severe ( $18.19 \pm 1.08$  to  $23.81 \pm 23.81$  nmol) COPD groups after PM<sub>2.5</sub> incubation. The carbonylation values in both cases were higher when compared with those produced by the Fenton reaction

(Figure 4A). Figure 4B shows the significant inverse regression of the carbonyl concentration versus the glucose-6 phosphate dehydrogenase activity ( $p < 0.0001$ ,  $r = -0.6966$ ). Figure 5 shows the non-protein SH group concentration (Figure 5A) and the glucose-6 phosphate activity (Figure 5B) measured in the RBC supernatant obtained from HV and COPD patients before and after the RBC-PM<sub>2.5</sub> incubation. The SH group concentration was significantly decreased ( $p < 0.0001$ ) in COPD patients ( $6.5 \pm 1.9$  and  $4.38 \pm 0.9$  nmol/mg protein for moderate and severe COPD patients) when compared with healthy volunteers ( $8.06 \pm 1.31$  nmol/mg protein). As shown in Figure 5B, the RBC glucose-6 phosphate dehydrogenase activity of COPD patients was also significantly ( $p < 0.0001$ ) less than that observed in healthy volunteer group ( $4.57 \pm 0.79$  nmol NADPH/mg protein) in both the moderate ( $3.04 \pm 0.63$  nmol NADPH/mg protein) and severe COPD groups ( $0.59 \pm 0.22$  nmol NADPH/mg protein). PM<sub>2.5</sub> incubation induced further significant decreases in the patients with moderately severe COPD. There was a significant ( $p < 0.01$ ) direct correlation ( $r = 0.4825$ ) between SH group concentration and glucose-6 phosphate activity (Figure 5C). The values obtained with the *in vitro* generation of ROS are described in the footnotes of Figures 5B and 5C. The activity of phosphotyrosine phosphatase showed a significant decrease in the three groups when the supernatant was incubated in presence of the PM<sub>2.5</sub> suspension (Figure 6) The inhibition was greater in the control group (HV) ( $p < 0.0001$ ), reaching a value of 53.52% less than basal control activity (from  $0.71 \pm 0.2$  to  $0.33 \pm 0.06$  nmol p-nitrophenol/10<sup>6</sup> RBC/min). The phospho-tyrosine activity also decreased in RBCs obtained from COPD patients, but the change was significant only in the moderate group. The Fenton reaction significantly decreased the PTPase activity in the control group when compared with the PM<sub>2.5</sub> incubation.

## 5. DISCUSSION

Protecting our health from the surrounding environment is a challenge, particularly for vulnerable populations, such as the elderly, children, pregnant women and their fetuses, residents in areas with poor to marginal outdoor air quality, and people suffering from chronic diseases. Exposure to particulate matter is associated with both short- and long-term cardiovascular and respiratory diseases and may increase the risk of cancer. Short-term exposure to particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) is associated with cardiovascular mortality in adults (24). Short-term exposure is also significantly associated, although less strongly, with excess emergency room visits and hospital admissions due to cardiovascular and respiratory symptoms (25). This clinical phenomenon is not observed in populations that have adapted to air pollution because their capacity for efficient antioxidant enzyme induction has been increased following years of exposure to contaminants (26, 27). Long-term exposure appears to increase the risk of developing chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and lung cancer. The cumulative effects of chronic exposure to PM<sub>2.5</sub> have been estimated to reduce the life expectancy for the US population by 1.3 years (28).

## Erythrocyte oxidative injury by PM2.5



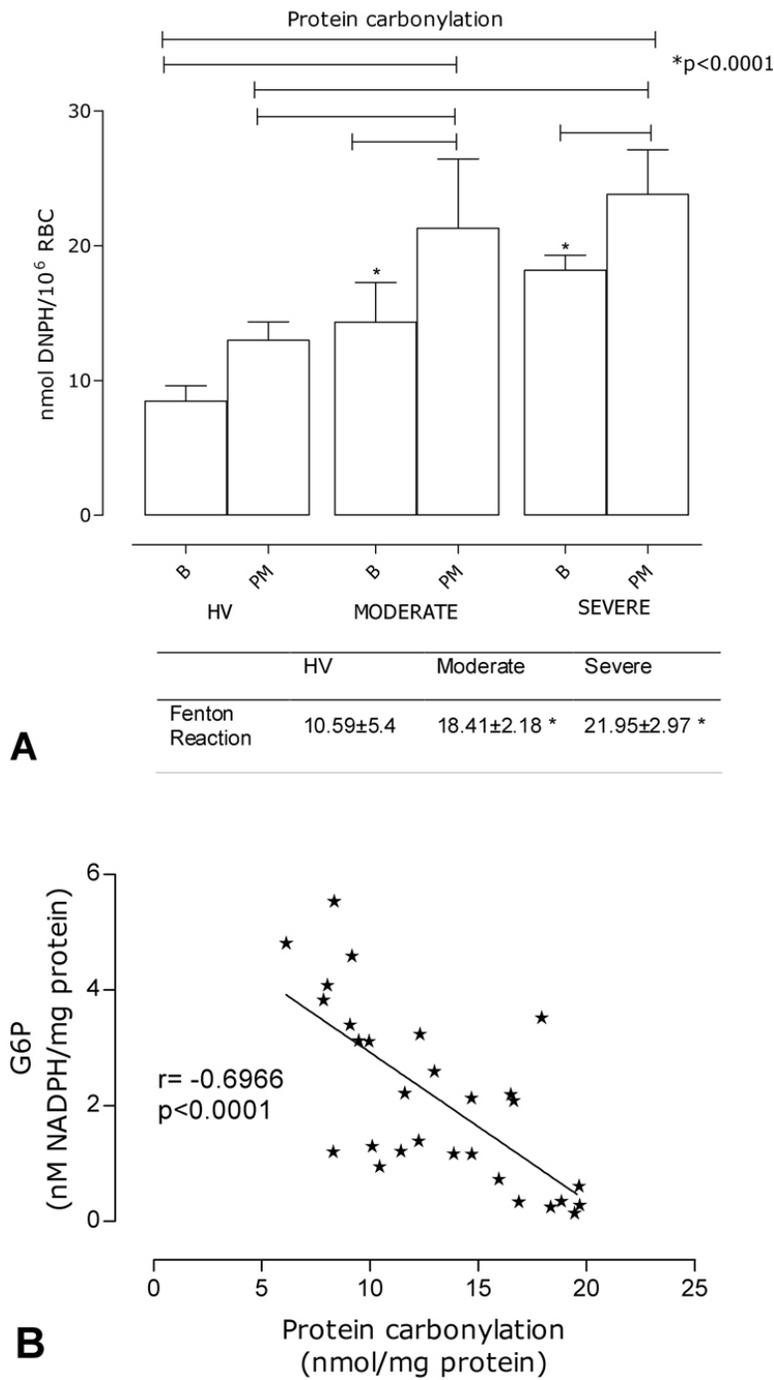
**Figure 3.** The (A) Conjugated dienes, (B) Lipohydroperoxide (LHP), and (C) Malondialdehyde (MDA) concentration measured in erythrocyte ghosts from moderate and severe COPD patients and healthy volunteers (HV) before and after PM<sub>2.5</sub> incubation.

Chronic obstructive pulmonary disease affects various lung structure and function, leading to air flow limitation (8). In addition to these pulmonary abnormalities, COPD is associated with significant detrimental effects in organs distant from the lungs. These systemic effects of COPD include weight loss, nutritional

abnormalities, skeletal muscle dysfunction, an increased risk of cardiovascular disease, and several neurological and skeletal effects (7). RBC oxidative injury in these patients affects enzymatic activities including the band-3 associated phospho-tyrosine phosphatase (29). The mechanisms underlying these systemic effects are unclear, although they are probably interrelated and multifactorial and may include inactivity, systemic inflammation, tissue hypoxia, and oxidative stress. However, the mechanisms that induce the increased susceptibility of COPD patients to air pollution and particulate matter have not yet been identified. In this study, we have shown *in vitro* the differences in the response of RBC from healthy volunteers compared with RBC from COPD patients incubated with PM<sub>2.5</sub>. An increase in oxidative stress in RBC has been reported in many pathological conditions, including COPD (7, 15, 31). Therefore, the decrease in PTPase activity is considered an excellent indicator of oxidative injury (29).

Our results indicate that depending on composition of PM, the oxidative injury of RBCs in COPD patients is increased in presence of PM<sub>2.5</sub>, which can generate ROS by different mechanisms (Table 2). ROS generation can partially result from redox cycling of hydrophobic substances, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and persistent quinoid radicals, which are usually bound to fine particles of the soot aggregates (Figure 1 and Figure 2) (28). Compounds found in the water-soluble fraction of PM elicit cell damage via reactive transition metal-dependent formation of hydroxyl radicals, implicating an important role of hydrogen peroxide. Together, these data indicate the importance of mechanisms involving redox cycling of quinones and Fenton-type reactions by transition metals in the generation of ROS (15). Table 2 shows the concentration of Fe<sup>++</sup> and Cu<sup>+</sup> transition metals distributed principally in spherical and irregular particles. In our assays, these particles induced injury in RBC membranes *in vitro*, increasing conjugate dienes and LHP formation (Figure 3A, Figure 3B). The generation of ROS from PM<sub>2.5</sub> can be due to iron and copper producing a Fenton reaction in biological fluids (15). Aromatic compounds present in the soot aggregate may also contribute to the generation of free radicals in our experiments (Table 2). However, to consider such a possibility, a hydrophobic medium is necessary to generate appropriate conditions for the ROS generation. The Fenton reaction used as a control for RBC membrane injury consistently showed similar degrees of oxidative damage compared with PM<sub>2.5</sub> (Figure 3C, 4A, 5B, Figure 6).

The observed decreases in both non-protein sulfhydryl concentration and G6PD activity were magnified by PM addition, showing a significantly inverse correlation (Figure 5 Figure 4A,  $r = 0.6966$ , Figure 5) when compared with the G6PD activity that decreased as consequence of COPD progression. G6PD is an intracellular enzyme that plays a key role in the protection of erythrocytes against oxidative stress. Reduced activity of G6PD renders RBCs susceptible to hemolysis under oxidative conditions by oxidant drugs and infection (33). The functional consequence of decreases in NADPH and non-protein SH availability in the RBCs is a reduction in antioxidant



**Figure 4.** (A) The protein carbonylation of RBC ghosts and its correlation with (B) G6PD activity of RBC in two COPD stages before and after PM<sub>2.5</sub> addition. Effect of the Fenton reaction.

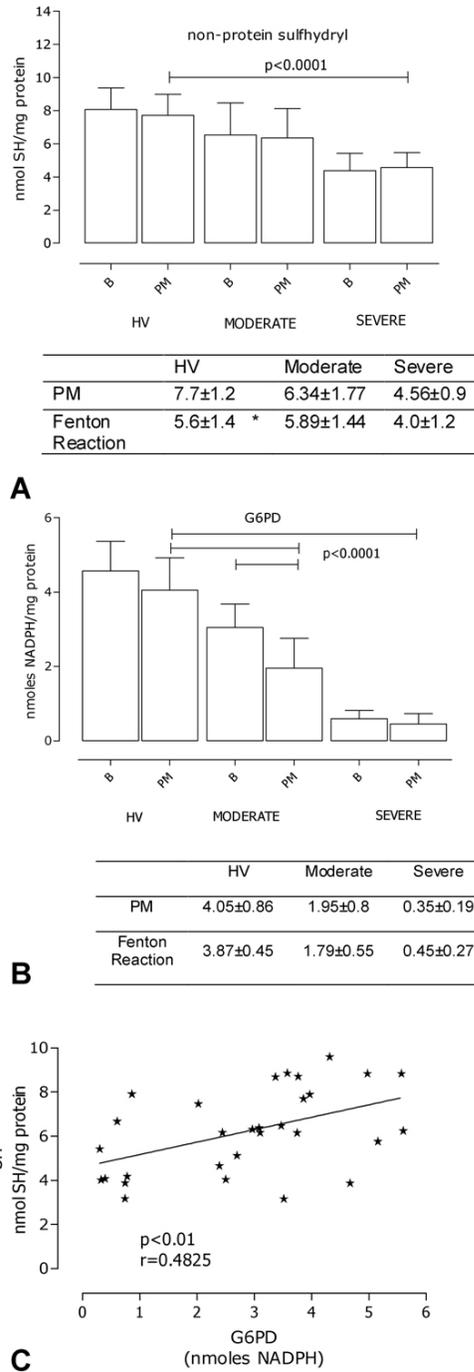
capacity and the loss of membrane molecular repair (Figure 5B)(34).

**6. CONCLUSION**

The interpretation of previous *in vitro* studies has proven difficult because particles of different chemical

compositions were used, target cells were different and experimental parameters, such as duration and end points, also differed. Particularly, results from “high doses” should be viewed with caution if they are orders of magnitude higher than predicted from relevant ambient exposures. The adverse health effects of PM are mediated by the carbonous particles of their reactive chemical compounds.

## Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub>



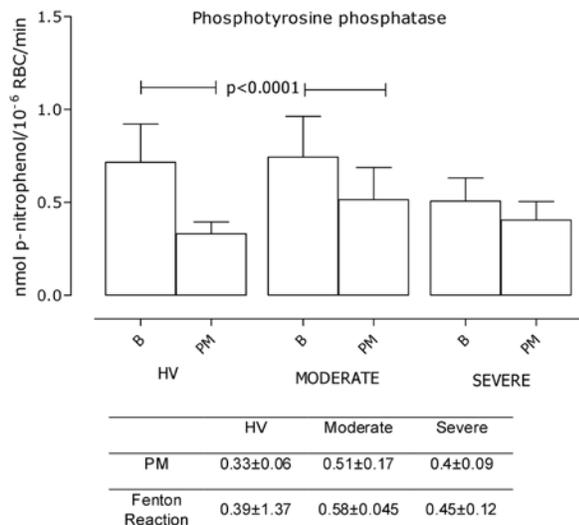
**Figure 5.** (A) The non-protein sulfhydryl concentration of RBC ghosts and its correlation with (B) G6PD activity in RBC. (C) Glucose-6 phosphate dehydrogenase activity in RBC in two COPD stages before and after PM<sub>2.5</sub> addition. Effect of the Fenton reaction.

Experimental evidence has shown that PM contains redox-active transition metals.

In summary, we demonstrated that, due to a lack of sufficient NADPH and non-protein SH groups for antioxidant activity, RBCs from a population susceptible to air pollution are more vulnerable to damage than RBCs

from healthy volunteers. Oxidative injury to membrane lipids and proteins were also demonstrated concomitant with a decrease of PTPase activity and altered function of anionic exchanger (AE<sub>1</sub>). Finally, it was possible to determine that cells with preexisting injury resulting from chronic disease (COPD) showed a greater chance of damage in the presence of particulate material from air

## Erythrocyte oxidative injury by PM<sub>2.5</sub>



**Figure 6.** Phospho-tyrosine phosphatase activity of erythrocyte membranes in two COPD stages before and after PM<sub>2.5</sub> addition. Effect of the Fenton reaction.

pollution compared with the susceptibility of cells from healthy volunteers. This is one of the first reports to demonstrate differences in the responses of cells from healthy and susceptible populations to pollution.

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

This paper will be included in a thesis to be submitted to the Graduate Council of Escuela Superior de Medicina. Instituto Politecnico Nacional Mexico; of Yessica D. Torres-Ramos, in partial fulfillment of the requirements for the Grado de Doctora en Ciencias en Investigación en Medicina. The authors gratefully acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and for their financial assistance and general support.

## 8. REFERENCES

1. Secretaría del Medio Ambiente, Gobierno del Distrito Federal. El Aire de la Ciudad de México. Gestión Ambiental del aire en el Distrito Federal 2000-2006.
2. D. Salcedo, T. B. Onasch, K. Dzepina, M. R. Canagaratna, Q. Zhang, J. A. Huffman, P. F. DeCarlo, J. T. Jaynee, P. Mortimer, D. R. Worsnop, C. E. Kolb, K. S. Johnson, B. Suberi, L. C. Marr, R. Volkamer, L. T. Molina, B. Cardenas, R. M. Bernabé, C. Marquéz, J. S. Gaffney, N. A. Marley, A. Laskin, V. Shutthanandan, Y. Xie, W. Brune, R. Leshner, T. Shirley, J. L. Jimenez. Characterization of ambient aerosols from Mexico City during the MCMA-2003 campaign with aerosols mass spectrometry: results from CENICA supersite. *Atmospheric Chem Phys* 6, 925-946 (2006)
3. M. P. Sierra-Vargas, A. M. Guzman-Grenfell, S. Blanco-Jimenez, J. D. Sepulveda-Sanchez, R. M. Bernabe-Cabanillas, B. Cardenas-Gonzalez, G. Ceballos, J. J. Hicks.

Airborne particulate matter PM<sub>2.5</sub> from Mexico City affects the generation of reactive oxygen species by blood neutrophils from asthmatics: an *in vitro* approach. *J Occup Med Toxicol* 29, 4-17 (2009)

4. T. Wang, E. T. Chiang, L. Moreno-Vinasco, G. D. Lang, S. Pendyala, J. M. Samet, A. S. Geyh, P. N. Breyse, S. N. Chillrud, V. Natarajan, J. G. García. Particulate matter disrupts human lung endothelial barrier integrity via ROS- and p38 MAPK- dependent pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42(4), 442-449 (2010)

5. N. Li, S. Kim, M. Wang, J. Froines, C. Sioutas, A. Nel. Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol* 14, 459-486 (2002)

6. B. Delinger, W. A. Pryor, R. Cueto, G. L. Squadrito, V. Hedge, W. A. Deutch. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 14, 1371-1377 (2001)

7. Y. D. Torres-Ramos, M. L. Garcia-Guillen, I. M. Olivares-Corichi, J. J. Hicks. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *The open Respiratory medicine Journal* 3, 61-66 (2009)

8. E. M. Drost, K. M. Skwarski, J. Saulea, N. Soler, J. Roca, A. Augusti and W. MacNee. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60, 293-300 (2005)

9. K. F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calvey, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. Van Weel, J. Zielinski. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176(6), 532-555 (2007)

10. E. Nagababu, J. G. Mohanty, S. Bhamidipaty, G. R. Ostera, J. M. Rifkind. Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sciences* 86, 133-138 (2010)

11. G. Lucantoni, D. Pietraforte, P. Matarrese, Gambardella L, A. Metere, G. Paone, E. Li Bianchi, E. Straface. The red Blood Cell as a Biosensor for Monitoring Oxidative Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: An *Ex vivo* and *In vitro* Study. *Antioxidants and Redox Signaling* 8(7-8), 1171-1182 (2006)

12. H. Passow, H. Fasold, E. M. Gärtner, B. Legrum, W. Ruffing, L. Zaki. Anion transport across the red blood cell membrane and the conformation of the protein in Band 3. *Ann N Y Acad Sci* 341, 361-383 (1980)

13. M. R. Miller, J. Hankinson, V. Brusasco, F. Burgos, R. Casaburi, A. Coates, R. Crapo, P. Enright, C. P. Van der Grinten, P. Gustafsson, R. Jensen, D. C. Johnson, N.

## Erythrocyte oxidative injury by PM2.5

- MacIntyre, R. McKay, D. Navajas, O. F. Pedersen, R. Pellegrino, G. Viegi, J. Wanger. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry *Eur Respir J* 26, 319-338 (2005)
14. R. Perez-Padilla, G. Valdivia, A. Muino, M. V. Lopez, M. N. Marquez, M. Montes de Oca, C. Talamo, C. Lisboa, J. Pertuze, B. Jardim JR, B. Menezes AM. Spirometric reference values in 5 large Latin American cities for subjects aged 40 years or over. *Arch Bronconeumol* 42, 317-325 (2006)
15. Ortega C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of PMSG by oxygen-free radicals, change its structure, affecting the hormonal activity. *Mol Reprod Dev* 52, 264-268, (1999)
16. T. L. Steck, J. A. Kant. Preparation of impermeable ghost and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol* 231, 172-180 (1974)
17. D. Gerard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Reganrd, N. Moze-Henry, J. C. Yadan, and J. Chaudiere. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10), 1176-1183 (1998)
18. K. Yagi. Sample procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free radical and Antioxidant Protocols* 108, 101-106 (1998)
19. R. O. Recknagel and E. A. Glende Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in enzymology* 105, 331-337 (1984)
20. A. Amici, R. L. Levine, L. Tsai, E. R. Stadtman. Conversion of amino acids residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. *J Biol Chem* 264(6), 3341-3346 (1989)
21. Y. Zipser and N. S. Kosower. Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. *Biochem J* 314, 881-887 (1996)
22. G.L. Ellman. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77 (1959)
23. NH. Kirkman. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 23, 2364-2370 (1962).
24. B Hackley, A Feinstein, J Dixon, Air Pollution: Impact on Maternal and Perinatal Health. *Journal Of Midwifery & Women's Health* 52, 435-443 (2007)
25. R. Medina-Navarro, A. Lifshitz, N. Wachter, J. J. Hicks. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch Med Res* 28(2), 205-208 (1997)
26. J.J. Hicks, R. Medina-Navarro, A. M. Guzmán-Grenfell, N. Wachter, A. Lifshitz. Possible Effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and Serum lipoperoxides in the Human Adult. *Arch Med Research* 27(2), 145-149 (1996)
27. R Rodriguez-Roisin. The airway pathophysiology of COPD: implications for treatment. *COPD* 2, 253-262 (2005)
28. J. Dejmek, I. Solansky, I. Benes, J. Lenícek, R. J. Sram. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environmental Health perspectives* 108(12), 1159-1164 (2000)
29. L. Bordin, C. Fiore, G. Doná, A. Andrisani, G. Ambrosini, D. Faggian, M. Plebani, G. Clari, D. Armani. Evaluation of erythrocyte band 3 phosphotyrosine level, glutathione content, CA-125, and human epididymal secretory protein E4 as combined parameters in endometriosis. *Fertil Steril* (2010) [Epub ahead of print]
30. E. Nagababu, J. G. Mohanty, S. Bhamidipaty, G. R. Ostera, J. M. Rifkind. Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sciences* 86, 133-138 (2010)
31. H. Passow, H. Fasold, E. M. Gärtner, B. Legrum, W. Ruffing, L. Zaki. Anion transport across the red blood cell membrane and the conformation of the protein in Band 3. *Ann NY Acad Sci* 341, 361-383 (1980)
32. M Schuurman, DV Waardenburg, JD Costa, H Niemarkt, P Leroy. Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency-case report and literature review. *Eur J Pediatric* 168, 779-782 (2009)
33. MM Abboud, W A-Awaida. Synchrony of G6PD activity and RBC fragility under oxidative stress exerted at normal and G6PD deficiency. *Clin Biochem* 43, 455-460 (2010)

**Abbreviations:** ROS: reactive oxygen species, COPD: Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, PTPase: phospho-tyrosine phosphatase, Air pollution, RBC damage. Tissue Hypoxia, Oxidative Stress, Erythrocyte, Anionic Exchanger, Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase, Free Radicals, Phosphotyrosine Phosphatase, PM: Particulate matters.

**Key Words:** Tissue, Hypoxia, COPD, Oxidative Stress, Erythrocyte, Anionic Exchanger, Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase, Free Radicals, Phosphotyrosine Phosphatase, PM, Particulate matter

**Send correspondence to:** Juan Jose, Hicks, Sub-Dirección de Investigación Biomedica, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales, Tel: 01152-5520-9900, Fax: 01152-5520-9900, E-mail: jjhicks2002@yahoo.com.mx