



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica

Cátedra de Química General e Inorgánica

Tesis de Doctorado

**Exposición aguda a partículas de
contaminación ambiental: Función cardíaca,
estrés oxidativo y mecanismos de respuesta
inflamatoria sistémica**

Timoteo Marchini

Director

Prof. Dr. Pablo Evelson

Año 2015

“Cree a aquellos que buscan la verdad, duda de los que la han encontrado”

André Gide

A mis padres Delia y Roberto

A la memoria de mis abuelas Aurora y Elsa

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis **Pablo Evelson**, por su guía y formación durante todos estos años. Por sus consejos y apoyo desde que era un estudiante, por su generosidad y, sobre todo, por su paciencia. Por estar siempre presente. Por ser el director que necesité en los momentos verdaderamente importantes, y por su buena música.

A **Silvia Alvarez**, por sus importantes aportes en el diseño de experimentos y discusión de resultados, así como por sus consejos tanto a nivel profesional como personal. Por preocuparse por mi bienestar.

A **Ricardo Gelpi y Verónica D'Annunzio**, por las mediciones de la función cardíaca y por sus aportes en la discusión de resultados y diseño de nuevos experimentos. Por su compromiso con nuestro trabajo.

A **Daniel Gonzalez Maglio y Mariela Paz**, por las mediciones de citoquinas y por sus aportes en la discusión de resultados propios y ajenos. Por su ayuda con la citometría de flujo. Por sus buenas ideas y consejos. Por su excelente predisposición en todo momento. Por haber contribuido en mi formación como estudiante, y haberme aceptado años después como colega.

A **Andreas Zirlik**, por abrirme las puertas de su laboratorio en Alemania. Por su liderazgo, generosidad, apoyo y consejo. Por su estímulo y ambición contagiosas. A **Dennis Wolf**, por sus ideas inagotables, por sus aportes en el diseño de experimentos y discusión de resultados, por su excelente predisposición y, sobre todo, por su pasión. A **Ingo Hilgendorf**, por sus ideas y aportes.

A los profesores de la cátedra de Química General e Inorgánica. En especial a **Susana Llesuy**, por su apoyo, buena predisposición y pasión compartida por San Lorenzo. A **Sandra Ferreira**, por su confianza y ayuda siempre que lo necesité. A **Marisa Repetto**, por el uso de su electrodo de oxígeno recién llegado. A los ayudantes de ayer y hoy, con los que compartimos grandes momentos dando clases.

A los profesores y docentes de la cátedra de Físicoquímica, en especial a **César Fraga**, por abrirme las puertas y permitirme trabajar cómodamente. A **Laura Valdez y Tamara Zaobornyj**, por sus consejos y aportes en la evaluación de la función mitocondrial. A **Mónica Galeano, Bárbara Piotrkowski y Valeria Calabro**, por su colaboración en las determinaciones por HPLC.

A mis compañeros del Atherogenesis Research Group Freiburg, en especial a **Nathaly Anto Michael**, por su ayuda y buena predisposición. Por los chocomuffins en la ventana después de horas y horas de experimentos. A **Markus Jäckel**, por su buena mano para las cirugías. A **Bianca Dufner, Natalie Hoppe y Lisa Schulte**, por su asistencia en los experimentos. A **Peter Stachon**, por su calidez.

A **Alberto Boberis**, por sus interesantes aportes y discusión de mis resultados.

A la **Facultad de Farmacia y Bioquímica**, por la formación que me brindó como estudiante de grado y posgrado, y por proporcionarme un lugar de trabajo.

A la **Universidad de Buenos Aires**, al **CONICET**, al **Servicio Alemán de intercambio Académico (DAAD)** y a la **Fundación BioThera**, por el financiamiento de los distintos proyectos que conformaron el presente trabajo de tesis.

A **Nat**, por su amistad y enorme sentido del compañerismo. Por lo sencillo que fue trabajar juntos. Por los buenos momentos en los congresos y por estar siempre presente para lo que sea. Por la cuota de bondad del laboratorio.

A **Vir**, por su energía, predisposición y buen humor en todo momento.

A **Lucho**, por su amistad. Por los momentos divertidos que compartimos dando clases. Por su ayuda con la citometría de flujo y por las meriendas. Por estar siempre dispuesto a escucharme.

A **Silvina** y **Darío**, por su excelente compañía. Por las tardes de mate discutiendo resultados y los buenos momentos en los congresos. Por hablar el mismo idioma.

A **Ceci**, por recorrer este camino juntos. Por su compañerismo, y, sobre todo, por su entendimiento, ya sea que nuestros laboratorios estén separados por un aula o por un océano.

A **Romi**, por los muchos momentos graciosos que compartimos en poco tiempo, por hacer del día a día en el laboratorio un lugar agradable. Por las meriendas.

A **Mary** y **Lourdes**, por su colaboración en los últimos experimentos y buena predisposición en todo momento. Por confiar en mí y brindarme su ayuda sin dudar.

A mis compañeros de la Facultad, que rápidamente pasaron a ser muy buenos amigos, en especial a **Leandro** y **Pablo**.

A mis amigos **Nils** y **Ale**, por los momentos compartidos. Por haber encontrado gente tan distinta pero tan parecida. Por la buena convivencia y por lo que aprendimos el uno del otro. Por alegrarse conmigo.

A mis hermanos que no tengo. Por el fútbol, los asados, las salidas y los viajes. Por los grandes momentos vividos juntos, y por siempre estar presente en las buenas o en las malas. A **Guido**, **Martín**, **Juani**, **Pablo**, **Martín** y **Nico**, un placer tocar en esta vida con ustedes.

A mis compañeros del Deportivo Sulfúrico, a **Benyi**; **Puche**, **Bona**, **Nacho** y **Guido**; **Mamber**, **Cani**, **Tibu**, **Juli**, **Perón** y **Rama**; **Beto**, **Marce** y **Bola**, por esa cuota fundamental de desconexión los fines de semana, y por el circo del día a día.

A mis padres, **Delia** y **Roberto**, por su apoyo incondicional. Por sus sacrificios. Por su confianza en mí y en mis decisiones. Por su paciencia y, sobre todo, por su entendimiento. Por alegrarse conmigo, o hasta más que yo.

A mi compañera de vida **Evgue**, por hacerme ser mejor cada día. Por bancarme, entenderme y tenerme paciencia. Por estimularme y querer lo mejor para mí. Por hacerme ver las cosas de otra manera. Toda esta historia hubiera sido mucho más difícil si vos no hubieras formado parte de ella.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados que conforman el presente trabajo de tesis se hallan incluidos en las siguientes publicaciones:

Alvarez S, Evelson P, Vanasco V, Magnani N, Cimolai MC, **Marchini T**. "The role of mitochondria in inflammatory syndromes". En: *Mitochondrial Pathophysiology*, 2011:233-47. Editado por Cadenas S y Palau F. Transworld Research Network. Kerala, India.

Marchini T, Magnani N, D'Annunzio V, Tasat D, Gelpi RJ, Alvarez S, Evelson P. Impaired cardiac mitochondrial function and contractile reserve following an acute exposure to environmental particulate matter. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1830(3):2545-52.

Marchini T, Magnani N, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, González Maglio DH, Alvarez S, Evelson P. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014;274(2):274-82.

Evelson P, Magnani N, **Marchini T**, Alvarez S. "Oxygen metabolism and mitochondrial function in the lung and heart after exposure to residual oil fly ash". En: *Fly Ash: Sources, Applications and Potential Environmental Impacts*, 2014:363-77. Editado por Sarker P. Nova Science Publishers Inc. New York, Estados Unidos.

Marchini T, Wolf D, Anto Michel N, Dufner B, Hoppe N, Jäckel M, Hilgendorf I, Tasat D, Bode C, Evelson P, Zirlik A. Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. En preparación.

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ΔpH	Gradiente de pH
Δt_{50}	Reserva diastólica cardíaca
ΔPDVI	Reserva contráctil cardíaca
ε	Coefficiente de extinción molar
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
ACS	Sociedad Americana contra el Cáncer (<i>American Cancer Society</i>)
ACV	Accidente cerebrovascular
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
BAL	Lavado bronquioalveolar
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Seroalbúmina bovina
CBA	Cytokine Beed Array [®]
CBRM1/5	Epitope de activación de CD11b
CEP	Células del exudado peritoneal
CK	Creatina kinasa
Clodr.	Diclorometil bifosfonato, clodronato
Complejo I	NADH ubiquinona oxidoreductasa
Complejo II	Succinato deshidrogenasa
Complejo III	Ubiquinona citocromo c oxidoreductasa
Complejo IV	Citocromo oxidasa
Complejo V	F ₀ -F ₁ ATP
CR	Control respiratorio
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DiOC ₆	Ioduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
E°	Potencial de reducción estándar
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDS	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPA	Agencia de Protección Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Estado 3	Estado de respiración mitocondrial activa
Estado 3 _u	Estado de respiración desacoplada
Estado 4	Estado de respiración mitocondrial pasiva
Estado 4 _o	Estado de respiración mitocondrial pasiva con oligomicina
FAD	Dinucleótido de flavina adenina
FADH [•]	Dinucleótido de flavina adenina semiquinona
FADH ₂	Dinucleótido de flavina adenina reducido

Fe ₂ O ₃	Hematita
Fe ₃ O ₄	Magnetita
FMN	Mononucleótido de flavina
FMNH [•]	Mononucleótido de flavina semiquinona
FMNH ₂	Mononucleótido de flavina reducido
FPM	Fuerza protón motriz
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación, glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HO [•]	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
i.p.	Inyección intraperitoneal
i.v.	Inyección intravenosa
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IL	Interleuquina
INF	interferón
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
ISO	Isoproterenol
k'	Constante de velocidad de pseudo primer orden
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
m-CCCP	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
MARCO	<i>Macrophage Scavenger Receptor with Collagenous structure</i>
Mac-1	Antígeno de macrófago 1, CD11b
MCP	Proteína quimioattractante de monocitos
MDA	Malondialdehído
MP	Material particulado
MP ₁₀	Partículas torácicas
MP _{10-2,5}	Partículas gruesas
MP _{2,5}	Partículas finas
MPO	Mieloperoxidasa
mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NADP ⁺	Dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina reducido
NAO	Bromuro de naranja de 10-N-nonilacridina
NF-κB	Factor nuclear κB
NLRs	Receptores tipo NOD (<i>NOD-like Receptors</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal

NO ₂ [•]	Radical nitrosilo
NO _x	Óxidos de nitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintasas
NOX	NADPH oxidasas
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Solución reguladora de fosfatos salina
PDVI	Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo
PMSE	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPC	Presión de perfusión coronaria
PRR	Receptores para el reconocimiento de patrones (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PUF	Partículas ultra finas
ROFA	<i>Residual Oil Fly Ash</i>
ROO [•]	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido orgánico
sICAM-1	Fracción soluble de la molécula de adhesión intercelular 1
SEM	Desvío estándar de la media
SNA	Sistema nervioso autónomo
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	<i>Side Scatter</i>
STE	Solución reguladora Sacarosa Tris-HCl EGTA
sVCAM-1	Fracción soluble de la molécula de adhesión de las células vasculares 1
t ₅₀	Relajación isovolumétrica (lusitropismo)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TLRs	Receptores tipo Toll (<i>Toll-like Receptors</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
TTF	1,3,5-trifenilformazan
U SOD	Unidad arbitraria de actividad de la enzima superóxido dismutasa
UQ	Ubiquinona
UQH [•]	Ubisemiquinona
UQH ₂	Ubiquinol
VCAM-1	Molécula de adhesión de las células vasculares 1



Introducción

La contaminación ambiental puede definirse como la presencia en la atmósfera de sustancias que, por su cantidad o permanencia, pueden ser capaces de producir daño tanto a la vida como a los materiales y estructuras creados por el hombre (Elsom, 1992). Este concepto no sólo considera los efectos adversos sobre la salud, sino que también incluye aspectos estéticos como la disminución de la visibilidad y la presencia de olores indeseables, rasgos característicos de las grandes ciudades con altos niveles de contaminación.

1. MARCO HISTÓRICO

En la segunda mitad del siglo XVIII, a comienzos de la revolución industrial, se creía que los desechos provenientes de la quema del carbón, y otros combustibles fósiles vertidos al medio ambiente, se diluían en la atmósfera de tal manera que no era posible que alcancen concentraciones tóxicas para la población. Sin embargo, desde principios del siglo XX, en reiteradas oportunidades se ha observado que la disminución de la calidad del aire se encuentra asociada con efectos adversos sobre la salud.

A lo largo de la primera mitad del siglo pasado, eventos extremos de contaminación ambiental se han correlacionado con una mayor morbilidad y mortalidad por diversas afecciones respiratorias. El primer hecho significativo tuvo lugar durante un período de nieblas que afectó al valle del río Mosa, Bélgica, en 1930 (Nemery y col., 2001). Durante los primeros días del mes de diciembre de dicho año, condiciones climáticas inusuales favorecieron la aparición de un espeso smog sobre esta zona densamente industrializada. Tres días después, se presentaron numerosos casos de afecciones respiratorias y se registraron más de 60 muertes, que fueron luego atribuidas a la disminución de la calidad del aire en la zona.

Un evento similar tuvo lugar en Donora, Pennsylvania, Estados Unidos, a finales de octubre de 1948. En aquella oportunidad, un escaso movimiento del aire sobre el oeste de Pennsylvania, Ohio y los estados vecinos contribuyó a que las emisiones provenientes de las industrias del acero situadas en el área saturaran el aire de la zona. Unas 7000 personas (de un total de 14000 residentes en el área) presentaron síntomas de afecciones respiratorias, más de 400 requirieron hospitalización y 20 murieron antes de que la niebla se dispersara (Helfand y col., 2001).

Hasta el momento, el evento más importante en lo que se refiere a establecer los efectos adversos sobre la salud producidos por la presencia de contaminante ambientales, debido a la magnitud del hecho, fue lo ocurrido en Londres en el año 1952 (Logan, 1953). Durante la primera semana de diciembre de ese año aconteció un período de tiempo frío combinado con condiciones climáticas caracterizadas por la ausencia de viento. El humo proveniente de la quema de carbón en residencias e industrias, mezclado con las emisiones de los automóviles, favoreció a la aparición un denso smog en cuestión de horas. El rápido descenso en los niveles de la calidad del aire se sucedió, con un retraso de menos de 1 día, con un aumento en la tasa de mortalidad en la zona (Figura 1).

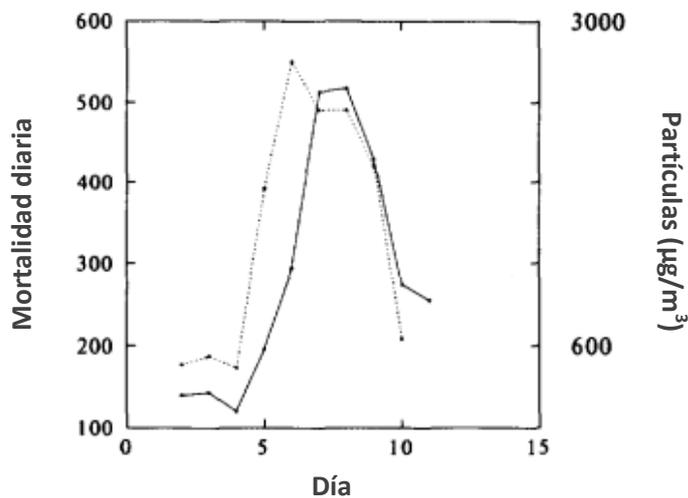


Figura 1. Concentración media de partículas en el aire (línea gruesa) y tasa de mortalidad diaria (línea punteada) en Londres, durante la primera quincena del mes de diciembre de 1952 (adaptado de Schwartz, 1994).

En ese entonces, las estimaciones iniciales realizadas por organismos oficiales alcanzaron las 4000 muertes prematuras y más de 100000 hospitalizaciones relacionadas a los efectos de la contaminación del aire. Sin embargo, estudios epidemiológicos posteriores (Bell y Davis, 2001) sugirieron que la mortalidad ascendió a un total de 12000 casos, debido a la sumatoria de los efectos agudos y crónicos del smog. Este episodio permitió a los investigadores llevar a cabo el primer análisis detallado de asociación entre el nivel de los contaminantes en el aire y el aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad en la población.

Los incidentes antes descritos tienen en común un aumento inusual de la concentración de contaminantes ambientales en la atmósfera, debido a un fenómeno climático conocido como *inversión térmica*. En condiciones normales, la temperatura de la tropósfera disminuye con la altura a razón de aproximadamente 6,5 °C/km. Durante una inversión térmica, la capa de aire que se encuentra más cercana a la superficie adquiere una temperatura menor a la de las capas superiores, por lo que se vuelve más densa y pesada. De esta manera, la capa superior (relativamente más caliente y, por lo tanto, menos densa) impide el movimiento vertical normal del aire. Esto hace que las emisiones provenientes de los escapes de los automóviles y la industria no se dispersen, acumulándose en las capas más bajas de la atmósfera hasta alcanzar concentraciones peligrosas para la salud. Este fenómeno se produce con mayor frecuencia en las noches despejadas de invierno, cuando el suelo ha perdido calor por radiación y las capas de aire cercanas a él se enfrían más rápido que las superiores. Por lo general, la inversión térmica termina cuando el aire que está en contacto con el suelo se vuelve a calentar, reestableciéndose el flujo normal de aire en la atmósfera. Esto puede darse en cuestión de horas, aunque ciertas condiciones climáticas desfavorables pueden hacer que la inversión persista durante varios días. Este es un fenómeno habitual en torno a grandes centros urbanos como Tokio, Nueva York, Ciudad de México, Seúl, San Pablo, Bombay, Beijing y Los Ángeles, que expone a millones de personas a los efectos nocivos de la acumulación de contaminantes ambientales en el aire.

Desde el incidente de Londres, se generó una gran cantidad de evidencia que fortaleció las conclusiones iniciales que relacionaban el aumento de los niveles de contaminación ambiental con efectos adversos sobre la salud (Dockery y col., 1993; Pope y col., 2004). La asociación se hizo aún más evidente cuando se registraron disminuciones en las tasas de morbilidad y mortalidad en relación a reducciones significativas de las emisiones de contaminantes atmosféricos. La primera observación al respecto fue un estudio realizado en más de 250000 residentes del valle de Utah, Estados Unidos, entre los años 1985 a 1988 (Pope, 1989). Debido a conflictos sindicales, una planta siderúrgica ubicada en la zona permaneció cerrada durante 12 meses. Durante ese período, los niveles de contaminación del aire disminuyeron a la mitad, y se registró una caída de entre dos y tres veces en la tasa de admisiones en los hospitales del área por afecciones respiratorias. Otro ejemplo de dicha asociación es lo acontecido en Dublín, Irlanda, entre los años 1990 y 1996 (Clancy y col., 2002). Debido a una prohibición gubernamental a las ventas y utilización del carbón durante 72 meses, se registró una reducción promedio del 70% en el smog, y una concomitante disminución de la mortalidad cardiovascular en un 10,3% durante dicho período. Esto significó unas 250 muertes por año menos a causa de afecciones cardiorrespiratorias.

A lo largo de las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos para reducir las emisiones de contaminantes mediante diversas reglamentaciones y políticas ambientales. Sin embargo, según el último informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que más de 7 millones de muertes prematuras por año aún pueden ser atribuidas a los efectos de la inhalación de aire contaminado (OMS, 2014).

2. COMPONENTES DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación ambiental proviene de una amplia variedad de fuentes, entre las cuales se destaca la combustión de combustibles fósiles por el tráfico vehicular y la actividad industrial. De acuerdo al modo de liberación en ambientes interiores y exteriores, los contaminantes del aire pueden ser clasificados como: (a) sustancias directamente emitidas a la atmósfera, llamadas *contaminantes primarios*; y (b) compuestos que se forman como resultado de reacciones químicas con otros contaminantes o gases atmosféricos, conocidos como *contaminantes secundarios* (Bernstein y col., 2004). Además, los contaminantes ambientales también pueden ser diferenciados en dos grandes grupos según las características químicas de sus constituyentes en: (a) *gases contaminantes*, como los óxidos de nitrógeno (NO_x), el CO, el SO_2 y el O_3 ; y (b) *materia particulada* (MP) (Evelson y col., 2008).

2.1. GASES CONTAMINANTES

Los NO_x presentes en el aire contaminado incluyen al NO, NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4 y N_2O_5 . A pesar que existen algunas fuentes naturales, el principal origen de los NO_x es antropogénico y se encuentra directamente relacionado con el tráfico vehicular. Durante los procesos de combustión a altas

temperaturas que ocurren en los motores de combustión interna, el N_2 atmosférico puede ser oxidado primero a NO y luego a NO_2 . El NO es un gas incoloro, que se convierte fácilmente en NO_2 en presencia de O_2 . El NO_2 es un gas de color marrón-rojizo intenso, y es la forma más importante de los NO_x desde el punto de vista toxicológico. Cuando el NO_2 es inhalado, se disuelve en los fluidos pulmonares y produce daño tisular directo a través de la formación de HNO_2 y HNO_3 (Last y col., 1994).

El CO es un producto de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Es un gas incoloro, inodoro e insípido que se une a la hemoglobina con una afinidad 250 veces mayor que la del O_2 . La unión del CO a la hemoglobina conduce a la formación de carboxihemoglobina, que a su vez tiene una afinidad mayor por el O_2 que la oxihemoglobina. Así, el CO interfiere con una adecuada distribución sistémica del O_2 a los tejidos. Además, entre otras proteínas, el CO se une a la citocromo oxidasa, lo que agrava el cuadro de hipoxia tisular (Rauba y col., 2000).

El SO_2 es un gas incoloro altamente irritante. La principal fuente de SO_2 es la quema de carbón y otros combustibles fósiles que contengan trazas de azufre. En la atmósfera, el SO_2 se oxida rápidamente a SO_3 . Ambos óxidos, al entrar en contacto con el H_2O , forman H_2SO_3 y H_2SO_4 , respectivamente. Estos oxoácidos del azufre, junto con los del nitrógeno, son componentes de la lluvia ácida y tienen un gran poder corrosivo. De hecho, son los responsables del deterioro de materiales de construcción formados por $CaCO_3$, como la piedra caliza y el mármol (Lipsett, 2001). La formación de los oxoácidos del azufre en fluidos biológicos explica los efectos tóxicos del SO_2 en ojos, membranas mucosas y piel. Cuando es inhalado, el SO_2 se comporta como un irritante del tracto respiratorio superior, produciendo broncoconstricción y aumento de las secreciones mucosas, incrementando así la resistencia del flujo de aire hacia el pulmón. Niveles elevados de SO_2 se han asociado con la prevalencia de diversas enfermedades producidas durante las grandes catástrofes ambientales a lo largo del siglo XX. Sin embargo, los incrementos en la morbilidad y mortalidad observados no se atribuyen a un efecto directo del SO_2 , sino a la formación secundaria de sulfatos en el MP por interacción entre el SO_2 y los diversos componentes del mismo (Sunyer y col., 2003).

El O_3 es un gas azulado altamente reactivo. Aunque su papel es esencial en la estratósfera para evitar que la radiación UV de alta energía penetre hasta la tropósfera, ha sido reconocido como el componente principal del smog fotoquímico, por lo que también se lo considera un gas contaminante. En las capas más bajas de la atmósfera, el O_3 se forma principalmente por la acción de la radiación UV sobre los NO_x , emitidos por los automóviles y la industria. El alvéolo pulmonar es la estructura biológica que más se observa afectada luego de la inhalación de O_3 , dado que produce engrosamiento de la pared alveolar y alteraciones del intercambio gaseoso (Yang y Omaye, 2009).

2.2. MATERIAL PARTICULADO

El MP está compuesto por una mezcla heterogénea de partículas sólidas y líquidas suspendidas en el aire. Puede provenir de múltiples fuentes de origen y es altamente variable en tamaño, relación

superficie/volumen y composición química. Las partículas llamadas *primarias* son las que se emiten directamente a la atmósfera, como las provenientes de la quema de combustibles fósiles, mientras que las partículas *secundarias* son las que se forman en el aire como resultado de la transformación fisicoquímica de otros contaminantes y gases, tales como los nitratos y sulfatos asociados al MP provenientes de los NO_x y SO_2 gaseosos, respectivamente (Bernstein y col., 2004).

El MP también puede clasificarse de acuerdo a sus fuentes de emisión en natural o antropogénico. El MP de fuentes naturales incluye al polvo, el polen, el moho y las partículas provenientes de los incendios forestales, las emisiones volcánicas y la bruma marina. Las fuentes antropogénicas consisten principalmente en emisiones provenientes del tráfico vehicular, del desgaste de los neumáticos y de la combustión de combustibles fósiles durante la generación de energía y procesos industriales diversos, como la metalurgia y la minería (Nel, 2005).

Una gran variedad de compuestos han sido descritos como constituyentes del MP antropogénico, siendo los componentes más comúnmente encontrados los iones de no metales (NH_4^+ , NO_3^- y SO_4^{2-}), carbono elemental, compuestos orgánicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos), endotoxinas y metales pesados (Fe, Cu, Ni, Zn y V, entre otros) (Tao y col., 2003).

Debido a su alta complejidad química y naturaleza variada, la clasificación más utilizada es aquella que se basa en su diámetro aerodinámico (Figura 2). Las partículas que presentan un diámetro aerodinámico menor a $10 \mu\text{m}$ se denominan "partículas torácicas" (MP_{10}). A su vez, las partículas torácicas que poseen un diámetro aerodinámico entre 10 y $2,5 \mu\text{m}$ se las define como "partículas gruesas" ($\text{MP}_{10-2,5}$), mientras que a las partículas de $2,5 \mu\text{m}$ o menos se las agrupa como "partículas finas" ($\text{MP}_{2,5}$). Por último, las partículas con un diámetro aerodinámico menor a $0,1 \mu\text{m}$ se clasifican como "partículas ultrafinas" (PUF). En general, la fracción gruesa del MP deriva de fuentes naturales mientras que las partículas finas y ultrafinas tienen predominantemente un origen antropogénico, dado que son producidas principalmente durante los procesos de combustión de combustibles fósiles (Brunekreef y Holgate, 2002).

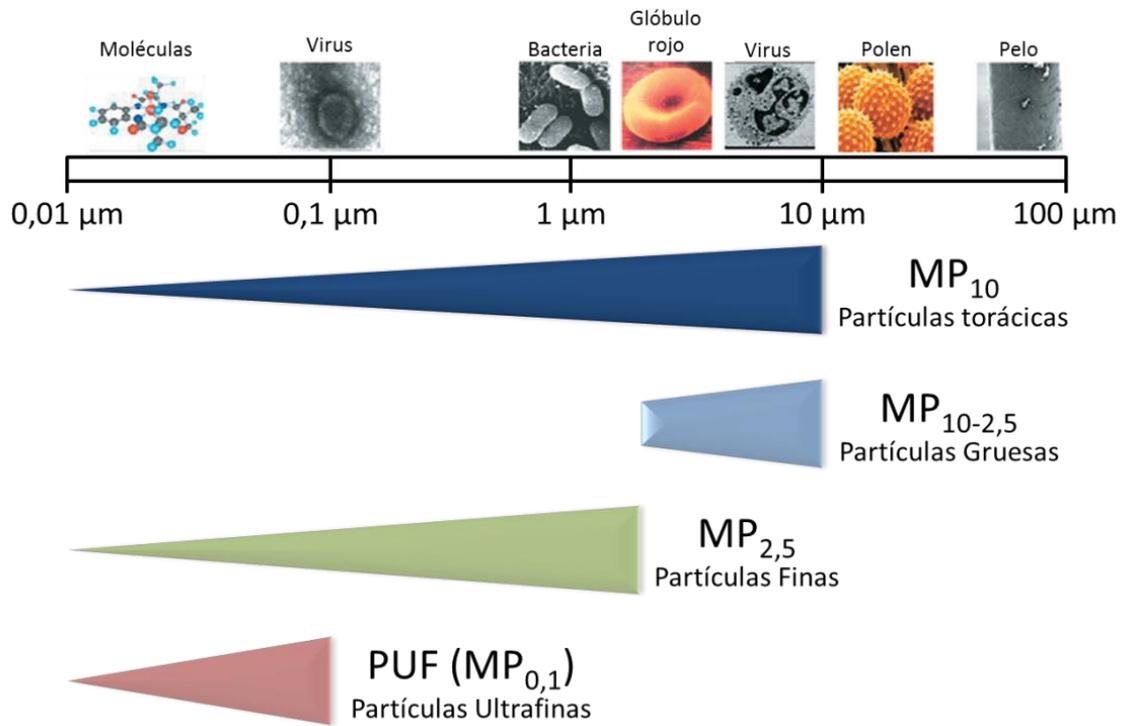


Figura 2. Clasificación de las distintas fracciones del MP según su tamaño (adaptado de Brook y col., 2004).

La clasificación del MP basada en el tamaño de la partícula se relaciona con la penetración diferencial de las mismas en el sistema respiratorio. Las partículas gruesas muestran una mayor deposición extra torácica (nariz, faringe, laringe) y en las regiones traqueobronquiales superiores. Por lo general, el MP depositado en esta región es eliminado rápidamente por el sistema mucociliar sin mayores complicaciones. Sin embargo, las partículas finas y ultrafinas son capaces de penetrar más profundamente en los pulmones, llegando hasta los alvéolos y aumentando significativamente su potencial tóxico (Oberdörster y col., 2005). Más aún, se ha postulado que las PUF incluso pueden ser capaces de atravesar el epitelio respiratorio y llegar a circulación sistémica en minutos, provocando efectos directos sobre otros tejidos y órganos además del pulmón (Nemmar y col., 2002).

Además de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de los diferentes subtipos de partículas, distintas variables atmosféricas (como la presión, temperatura, viento y humedad) influyen en su vida media y distribución. Por un lado, las partículas gruesas y finas son capaces de permanecer en suspensión en el aire durante horas, días e incluso semanas, y se distribuyen regionalmente (desde cientos hasta miles de km). Por otro lado, las PUF tienen una vida media significativamente más corta (de minutos a horas) y tienden a aglomerarse rápidamente en partículas más grandes. De esta manera, las PUF se distribuyen a unos pocos cientos de metros más allá de su fuente (Nel y col., 2006). En consecuencia, la inhalación de PUF tiene mayor relevancia en relación con las exposiciones ocupacionales, mientras que los efectos adversos sobre la salud debido a la exposición ambiental se encuentran probablemente más relacionados con la inhalación de partículas gruesas y finas.

Las partículas gruesas son el principal contribuyente a la masa total del MP en aire, debido a su mayor tamaño. Sin embargo, el interés toxicológico se centra principalmente en las partículas finas y ultrafinas, dado el mayor número de partículas por unidad de concentración, la mayor adsorción de compuestos tóxicos en su superficie relativamente alta y la penetración más profunda en el árbol respiratorio (Delfino y col., 2005). Además, los estudios epidemiológicos han mostrado asociaciones más claras entre los efectos adversos sobre la salud y los niveles de partículas finas en el aire, con respecto a las otras fracciones del MP (Simkhovich y col., 2008). A pesar de esto, aun no se ha establecido si los efectos tóxicos de la inhalación de MP se deben al tamaño de partícula o a su composición química, o a una combinación de ambos factores.

La concentración atmosférica del MP se determina y regula como la masa total de partículas por volumen de aire ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Los niveles diarios y anuales promedio del $\text{MP}_{2,5}$ a nivel mundial varían de menos de 10 a más de 65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Figura 3). Muchas ciudades tienen niveles anuales promedio entre 5 y 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (van Donkelaar y col., 2010). Sin embargo, las concentraciones del MP en las horas pico y los niveles personales de exposición dentro de ciertos microambientes puede llegar a superar los 200-500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Estas concentraciones son comparables a las que una persona se encuentra expuesta como producto del tabaquismo pasivo (500-1500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Brook, 2008).

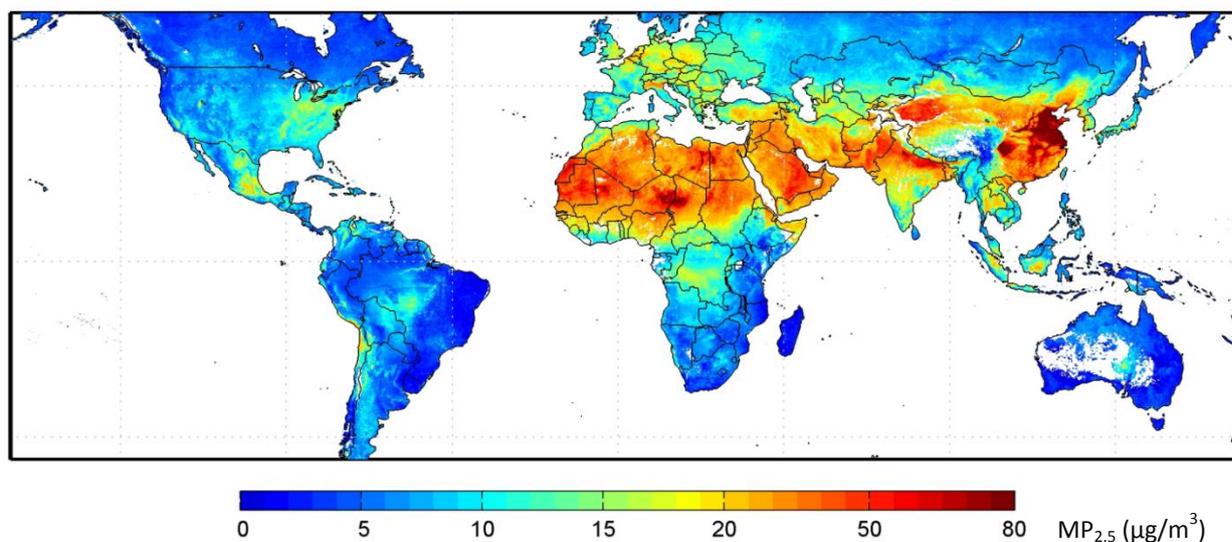


Figura 3. Valores anuales promedio de $\text{MP}_{2,5}$ alrededor del mundo entre los años 2001 a 2006, estimado a partir de mediciones satelitales de la densidad óptica de la atmósfera (adaptado de van Donkelaar y col., 2010).

La concentración ambiental del MP es uno de los seis criterios principales para los cuales la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha establecido estándares de calidad del aire. De acuerdo con estas normas, la concentración media anual de las partículas finas no debe exceder los 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que la concentración media diaria no debe superar los 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En lo que refiere a las partículas gruesas, la media diaria no debe superar los 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ más de una vez al año, considerando un promedio de 3 años consecutivos (EPA, 2012). Como se puede observar en la Figura 3,

extensas áreas geográficas alrededor del mundo, dentro la cuales se encuentran centros urbanos densamente poblados, no se ajustan a estos criterios.

Más allá de la naturaleza compleja de la contaminación del aire y la coexistencia de un gran número de compuestos que pueden contribuir conjuntamente al impacto negativo sobre la salud, una gran cantidad de estudios epidemiológicos señalan que las partículas finas son las principales responsables de los efectos adversos reportados (Xia y col., 2009).

2.2.1. RESIDUAL OIL FLY ASH

Se han utilizado distintos tipos de MP para el estudio de los efectos biológicos causados por la exposición al mismo. Desde un primer momento, el interés principal ha sido el de identificar qué características específicas o componentes del MP son los mediadores de los efectos observados. Por ello, debido a su relevancia como contaminante ambiental y composición química característica, las partículas ROFA (Residual Oil Fly Ash, por sus siglas en inglés) son especialmente útiles.

ROFA es un subproducto inorgánico proveniente de la utilización del combustible fósil conocido como aceite residual o *fueloil*, en industrias y centrales eléctricas. El fueloil es un residuo altamente viscoso del fraccionamiento del petróleo crudo, donde el azufre y los metales pesados tienden a concentrarse para optimizar la calidad de las otras fracciones de la destilación del petróleo, como las naftas, kerosenes y el gasoil. Debido a su bajo costo relativo y alta capacidad calorífica, el fueloil es frecuentemente utilizado para la obtención de energía en centrales eléctricas. Se calcula que, sólo en los Estados Unidos, se utilizan entre 20 y 25 mil millones de litros de fueloil por año (Hays y col., 2009). Dado el reconocido impacto ambiental provocado por el uso de este tipo de combustible, su utilización se encuentra en franco descenso. De hecho, a fines del año 2014, la demanda de fueloil fue la mitad de la registrada para el año 2004 y 6 veces menor al máximo de demanda registrado a fines de la década de 1970 (más de 175 mil millones de litros por año). Sin embargo, muchas centrales eléctricas lo siguen utilizando en la actualidad, liberándose a la atmósfera unas 50000 toneladas de ROFA por año, sólo en los Estados Unidos (Ghio y col., 2002a).

Al igual que la mayoría del MP proveniente de fuentes antropogénicas, ROFA se compone principalmente de partículas finas y ultrafinas, por lo que reviste importancia desde el punto de vista toxicológico. De hecho, se ha reportado que la inhalación de ROFA induce alteraciones respiratorias severas en operadores de calderas industriales (Hauser y col., 1995), y como consecuencia del uso de fueloil en calderas domésticas (Ghio y col., 2001). La composición química de ROFA ha sido caracterizada en numerosos estudios mediante el uso de técnicas basadas en la microscopía electrónica y espectroscopia de rayos X. De esta manera, se comprobó que las partículas ROFA están compuestas por un centro de carbono grafito, son especialmente ricas en metales de transición (principalmente Fe, Ni y V) y presentan un bajo contenido de compuestos orgánicos (Schroeder y col., 1987).

La principal forma del Fe en ROFA es el $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, seguido de pequeñas cantidades de los óxidos hematita (Fe_2O_3) y magnetita (Fe_3O_4). En cuanto al Ni, el NiSO_4 es la especie predominante, formando una estructura compleja junto con MgSO_4 , ZnSO_4 y trazas de NiAl_2O_4 . Por último, el compuesto más frecuente del V en ROFA es el VOSO_4 , seguido de cantidades menores de V_2O_5 , NaVO_3 , CaV_3O_7 y $\text{Ni}_3(\text{VO}_4)_2$ (Chen y col., 2004). Dependiendo de las condiciones de combustión del fueloil, ROFA puede también contener cantidades variables de Fe y Ni en forma de un óxido insoluble (NiFe_2O_4), modificando la toxicidad potencial de ROFA según la fuente a partir de la cual fue producido (Huggins y col., 2011; Pattanaik y col., 2012).

Debido a la reconocida capacidad intrínseca que poseen estos metales de transición para inducir daño oxidativo a través de reacciones químicas tipo Fenton (Leonard y col., 2004), ROFA es el modelo de MP más frecuentemente utilizado para evaluar la hipótesis de que los metales de transición son los principales mediadores de los efectos biológicos adversos producidos por la inhalación de aire contaminado.

3. EFECTOS ADVERSOS SOBRE LA SALUD PRODUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN AL MP

3.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los estudios epidemiológicos se pueden dividir en aquellos realizados a corto plazo (análisis temporal realizado a las pocas horas o días luego de una exposición) y los realizados a largo plazo (análisis de la supervivencia en cohortes durante años de exposición). Los estudios a corto plazo suelen asociar un cierto número de eventos (por ejemplo, las muertes y hospitalizaciones) con los cambios en los niveles diarios del MP en una región seleccionada. Los estudios a largo plazo suelen comparar la supervivencia de las personas que viven en determinadas áreas, que difieran en los niveles del MP en el aire en forma crónica.

Los primeros análisis realizados mostraron un efecto adverso sobre la salud por exposición a niveles elevados de contaminación ambiental a largo plazo. Los dos trabajos más importantes al respecto son el estudio de las “Seis Ciudades” realizado por la Universidad de Harvard (Dockery y col., 1993) y el realizado por la Sociedad Americana contra el Cáncer (ACS) (Pope y col., 1995). En ambos casos se encontró una correlación positiva entre los niveles del MP en la atmósfera y el incremento en las tasas de mortalidad, la cual fue mayor para enfermedades cardiovasculares con respecto a las respiratorias. Estudios posteriores sobre las mismas cohortes reafirmaron las conclusiones iniciales (Krewski y col., 2004), e incluso han reportado que las reducciones en los niveles del MP durante los años subsiguientes a los primeros análisis se asociaron con disminuciones en las tasas de mortalidad (Pope y col., 2002; Laden y col., 2006). Por otro lado, se ha observado que al aumentar el tamaño de la cohorte estudiada en ambos trabajos, el aumento de la mortalidad en relación a la exposición a MP fue significativamente mayor que la estimada originalmente (Eftim y col., 2008). Luego de estos trabajos, numerosos estudios llegaron a conclusiones similares analizando diversas cohortes en ciudades

estadounidenses (McDonnell y col., 2000; Chen y col., 2005; Enstrom, 2005; Lipfert y col., 2006; Miller y col., 2007; Puett y col., 2008; Zeger y col., 2008) y europeas (Filleul y col., 2005; Gehring y col., 2006; Naess y col., 2007; Beelen y col., 2008) (Figura 4). Tomando todos los datos obtenidos en su conjunto, se puede estimar que la mortalidad a largo plazo se incrementa en alrededor de un 10% por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que aumentan los niveles de MP en la atmósfera (Brook y col., 2010).

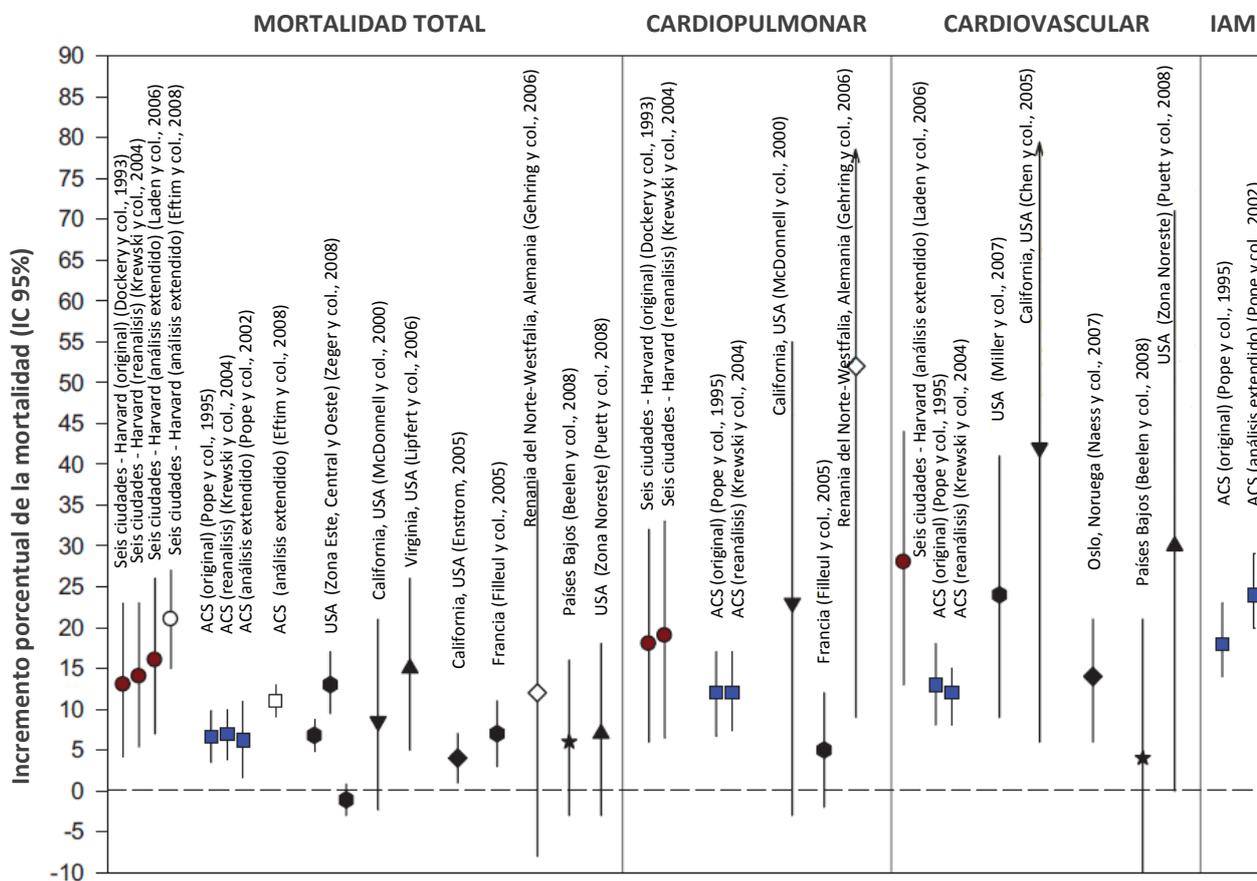


Figura 4. Aumentos porcentuales de la tasa de mortalidad por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de incremento en los niveles de MP ambiental, provisto por distintos estudios epidemiológicos. Los resultados se muestran como el valor medio calculado junto con el intervalo de confianza del 95%. IAM, infarto agudo de miocardio (adaptado de Brook y col., 2010).

Una gran cantidad de estudios encontraron que las tasas de mortalidad y hospitalización también aumentan significativamente en relación a exposiciones al MP de corto plazo (Katsouyanni y col., 2001; Brunekreef y Holgate, 2002; Analitis y col., 2006). Uno de los trabajos realizados a mayor escala consistió en el análisis de las tasas de mortalidad en las 20 ciudades estadounidenses más densamente pobladas, entre los años 1987 a 1994. Al incluir como objeto de estudio a una población total superior a los 50 millones de personas, se estimó que la mortalidad aumenta en un 0,5% en relación a variaciones diarias en los niveles del MP de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Samet y col., 2002). Estudios posteriores en distintas cohortes confirmaron estos hallazgos, observándose una asociación pequeña pero consistente de aproximadamente un 0,4 a 1,0% de incremento en la mortalidad por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento en los niveles diarios de MP. Esto es, la muerte prematura de 1 persona por día en un área de 5 millones de personas (Miller y col., 2012). Es importante destacar que, a pesar de que se ha

estimado un riesgo similar de mortalidad por afecciones cardiovasculares y respiratorias en relación a la exposición al MP, el 69% del incremento absoluto en la mortalidad se debió a enfermedades cardiovasculares, mientras que sólo un 28% se debió a enfermedades respiratorias (Pope, 2000). Actualmente, los hallazgos reportados luego de exposiciones diarias al MP apoyan la idea de que la inhalación de MP durante un corto período de tiempo puede actuar como un disparador de eventos cardiovasculares agudos (Mills y col., 2009).

Algunos autores sugieren que la relación entre la mortalidad y la exposición al MP es relativamente lineal en función del logaritmo de la dosis de MP inhalado, y que no parecería existir un umbral por debajo del cual desaparecen los efectos nocivos para la salud, incluso a niveles inferiores a $3\text{-}5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$. Esto indica que cualquier reducción en la exposición al MP se traducirá en beneficios para la salud de la población, y sugiere que una mayor disminución en los niveles de MP producirá una mayor reducción de la mortalidad (Brook y col., 2010). Por otro lado, la relación entre la mortalidad y la dosis del MP inhalado sugiere que a niveles relativamente bajos de mismo, el riesgo de mortalidad por causas cardiovasculares aumenta significativamente, mientras que a niveles más altos de exposición (como en el caso de fumadores activos) dicha relación llega a una meseta (Pope y col., 2009).

Aún no se ha establecido si existe un riesgo para la salud por exposiciones a largo plazo que sea totalmente independiente de la suma de los efectos agudos que se producen durante el período considerado (Polichetti y col., 2009). En este sentido, se ha sugerido que las exposiciones durante semanas o meses dan cuenta de los mayores efectos sobre la mortalidad cardiovascular, por sobre las exposiciones durante años o décadas (Goodman y col., 2004). Por otro lado, se acepta que los incrementos en las tasas de mortalidad se deben principalmente a afecciones cardiovasculares. Como ha publicado la OMS en su último informe, un 80% de las muertes prematuras asociadas a la contaminación ambiental se deben a enfermedades cardiovasculares como la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular (ACV), en comparación con un 20% de las muertes debidas a afecciones respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el cáncer de pulmón y las infecciones respiratorias bajas (OMS, 2014).

3.2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL MP SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Entre las principales causas del incremento en la morbilidad y la mortalidad producto de la contaminación del aire, el hallazgo más frecuente es una mayor incidencia de infarto agudo de miocardio (IAM) (Pope y col., 2004). Esta asociación parecería darse luego de la inhalación de MP durante un período relativamente corto de tiempo, dado que se ha reportado que exposiciones de entre 1 y 2 h son suficientes como para incrementar significativamente el riesgo de sufrir un IAM (Peters y col., 2001). Este riesgo, incluso, parecería ser mayor durante el mismo día en el que ocurre la exposición, que durante los días subsiguientes (Pope y col., 2006). Además, se ha observado que la inhalación de altos niveles de MP se encuentra asociada a un peor pronóstico luego de haber sufrido un primer IAM

(Zanobetti y Schwartz, 2007). Seguido a la mayor incidencia de IAM, la segunda observación más frecuente es el incremento en el número de hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca (Dominici y col., 2006). Por último, las variaciones diarias en los niveles del MP en el aire también se encuentran asociados a aumentos en las hospitalizaciones por ACV, enfermedad vascular periférica y arritmias (Hoek y col., 2001).

A pesar de la gran cantidad de estudios que describen el efecto adverso sobre la salud debido a la exposición al MP de forma aguda y crónica, la existencia de poblaciones en riesgo aún no es clara. Se ha sugerido que la mayor incidencia se da principalmente en individuos susceptibles, pero no necesariamente en curso de alguna enfermedad. Las poblaciones más propensas parecerían ser los ancianos, niños, las personas de bajo nivel socioeconómico y los pacientes con diabetes o enfermedades cardiopulmonares crónicas preexistentes. Asimismo, tampoco es claro si el tabaquismo modifica el riesgo de mortalidad cardiovascular asociada a la exposición al MP, dado que algunos estudios sugieren cierto efecto aditivo mientras que otros lo descartan completamente (Martinelli y col., 2013).

4. MECANISMOS DE DAÑO PROPUESTOS

Los mecanismos biológicos propuestos que explican el efecto adverso de la exposición al MP sobre el sistema cardiovascular se pueden agrupar de la siguiente manera: a) un desequilibrio del sistema nervioso autónomo (SNA), impulsado por la estimulación de terminales nerviosas en el pulmón producto de la presencia de MP; b) la ocurrencia de estrés oxidativo disparada por la exposición al mismo; c) la liberación de mediadores proinflamatorios desde el pulmón en respuesta a la inhalación de MP; y d) la acción directa del MP, o de sus componentes solubles (como por ejemplo, compuestos orgánicos o metales de transición), capaces de traslocar a circulación sistémica a través del epitelio respiratorio, ejerciendo un efecto directo sobre órganos distantes distintos del pulmón (Chin, 2015).

4.1. LA EXPOSICIÓN AL MP Y EL DESEQUILIBRIO DEL SNA

Se ha sugerido que las alteraciones en los electrocardiogramas y la mayor incidencia de arritmias observadas luego de una exposición al MP podrían deberse a un desequilibrio en el funcionamiento del SNA (Langrish y col., 2009). Esta situación estaría caracterizada por un aumento del tono simpático y una disminución del tono parasimpático, iniciada por la activación de nociceptores en el pulmón en respuesta a la inhalación del MP (Ghelfi y col., 2008). Esto provocaría diversas alteraciones sobre el sistema cardiovascular como trastornos del ritmo cardíaco, disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y aumento de la presión arterial (Langrish y col., 2014).

El desequilibrio del SNA asociado a la inhalación de MP parecería desempeñar, además, un rol en la inhibición de la dilatación arterial normal y alteraciones de la función endotelial, reportadas por algunos autores en modelos animales de exposición al MP (Nurkiewicz y col., 2004; Knuckles y col.,

2013). Por último, el desequilibrio del SNA podría contribuir, al menos en parte, a la ocurrencia de estrés oxidativo cardíaco observado luego de una exposición al MP (Rhoden y col., 2005).

4.2. LA EXPOSICIÓN AL MP Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Numerosos estudios muestran la ocurrencia de estrés oxidativo en el sistema respiratorio y cardiovascular, producto de la inhalación de MP (Miller, 2014). En un modelo de exposición continua a ROFA en ratas, se han observado incrementos de 2 y 3 veces en la quimioluminiscencia *in vivo* de corazón y pulmón, respectivamente, en comparación con animales control respirando aire filtrado. Esta situación es indicativa de la ocurrencia de estrés oxidativo en estos órganos. Además, parecería encontrarse directamente asociada al contenido de metales de transición del MP, dado que al repetir el protocolo de exposición utilizando partículas compuestas únicamente por el núcleo de carbono de ROFA, los valores de quimioluminiscencia observados fueron similares a los del control (Gurgueira y col., 2002). En los últimos años, una gran cantidad de evidencia clínica y experimental, tanto *in vivo* como *in vitro*, confirmaron y caracterizaron estos hallazgos a nivel pulmonar (Magnani y col., 2011; Anderson y col., 2012). Se ha reportado, además, que la producción de radicales libres *in vivo* en el pulmón puede ser reproducida por la administración de una solución compuesta únicamente por la fracción soluble de ROFA (privada de las partículas sólidas), o incluso por una mezcla de sulfatos solubles de Fe, Ni y V (Dreher y col., 1997; Kadiiska y col., 1997). De esta manera, se ha establecido que los metales de transición del MP favorecen la ocurrencia de estrés oxidativo en el pulmón, y son los principales responsables de los efectos adversos sobre el sistema respiratorio que se observan luego de una exposición a ROFA. Sin embargo, poco se sabe a cerca de esta situación a nivel cardiovascular.

Por otro lado, se ha observado en diversos estudios en humanos que distintas exposiciones ocupacionales al MP producen un aumento en marcadores plasmáticos de oxidación a proteínas y peroxidación lipídica (Sørensen y col., 2003), así como en marcadores circulantes de daño oxidativo al ADN (Bräuner y col., 2007). Esto sugiere la ocurrencia de estrés oxidativo a nivel sistémico asociado a la exposición al MP, aunque los mecanismos involucrados en este proceso son poco claros.

4.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO: GENERALIDADES

El estrés oxidativo puede definirse como una situación en la cual las concentraciones intracelulares de las especies activas del O₂ se encuentran incrementadas por sobre los valores fisiológicos (Sies, 1985). El estrés oxidativo puede ser provocado tanto por un aumento en la velocidad de producción de especies oxidantes, así como por una disminución en los niveles de los sistemas antioxidantes, o por una combinación de ambas situaciones. Debido al desequilibrio entre la producción de especies activas del O₂ y los cambios del sistema de defensa antioxidante, se puede llegar a un aumento sostenido de las concentraciones de especies oxidantes en estado estacionario y, en

consecuencia, al daño oxidativo. Independientemente de la causa original, una concentración incrementada de las especies activas del O_2 induce un aumento en la extensión de las reacciones iniciadas por radicales libres, produciendo en consecuencia modificaciones en la estructura y función de componentes celulares diversos (Boveris y col., 2008).

4.2.2. ESPECIES ACTIVAS DEL O_2

La utilización del O_2 es un requerimiento esencial para la función y el desarrollo de la vida. Sin embargo, también puede resultar tóxico por la formación de productos derivados de su metabolismo. Estos productos son llamados especies activas del O_2 , y son capaces de alterar la homeostasis celular provocando daño a distintos componentes celulares. Algunas de estas especies, aunque no todas, son radicales libres (especies químicas con uno o más electrones desapareados, capaces de existir en forma independiente) derivados de la reducción parcial del O_2 .

El O_2 es un poderoso agente oxidante. Como tal, es capaz de oxidar moléculas al aceptar dos pares de electrones. Sin embargo, el O_2 puede también reducirse tomando un electrón a la vez, dando lugar a la formación de las especies activas del O_2 (Figura 5).

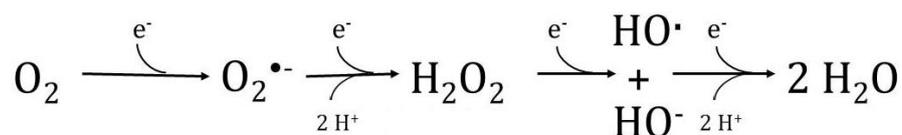
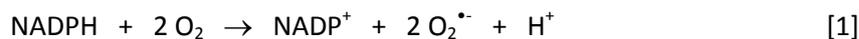


Figura 5. Secuencia de la reducción parcial del O_2 y formación de las especies activas del O_2 .

Cuando el O_2 en su estado basal acepta un solo electrón, el producto obtenido es el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Esta especie química es un radical libre, ya que posee un electrón desapareado. La incorporación de un segundo electrón da lugar a la formación de H_2O_2 , que no es un radical libre dado que no presenta electrones desapareados en su estructura. Igualmente, esta molécula es considerada una especie activa del O_2 ya que la unión O-O es relativamente débil (energía del enlace: 138 kJ/mol), lo que favorece su reactividad. La adición de un tercer electrón induce la formación del radical hidroxilo (HO^{\bullet}) por ruptura heterolítica de la molécula de H_2O_2 . El producto final de la reducción parcial del O_2 es el H_2O , formada luego de la incorporación de un cuarto y último electrón. Los intermediarios de la reducción parcial del O_2 : $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 y HO^{\bullet} , junto con el oxígeno singulete (1O_2) – un estado excitado del O_2 –, conforman el grupo de especies químicas denominado especies activas del O_2 .

El $O_2^{\bullet -}$, a pesar de ser un radical libre, es relativamente poco reactivo en solución acuosa ($E^\circ = -0,16$ V). Su carga negativa le impide atravesar el entorno hidrofóbico de las membranas biológicas, limitando significativamente su libre difusión. La principal fuente de producción del $O_2^{\bullet -}$ en condiciones fisiológicas es la respiración celular que ocurre a nivel mitocondrial, dado que se estima que el 1-2 % del O_2 total consumido por la célula es reducido a $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 en este proceso (Chance y col., 1979).

Existe un grupo de enzimas conocidas como NADPH oxidasas (NOX) que también pueden producir cantidades significativas de $O_2^{\bullet-}$ [1], de especial relevancia en procesos inflamatorios.



La principal vía de metabolización del $O_2^{\bullet-}$ es la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) [2].



En condiciones fisiológicas, el balance entre las vías de producción y catabolismo del $O_2^{\bullet-}$ hacen que su concentración en estado estacionario se mantenga en el orden de 1×10^{-11} M (Boveris y Cadenas, 1997).

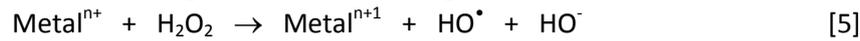
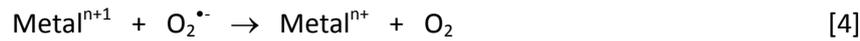
El H_2O_2 es generado directamente por reducción divalente del O_2 , o indirectamente por la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ catalizada por la SOD [2]. El H_2O_2 puede actuar tanto como agente oxidante como reductor, aunque su reactividad en soluciones acuosas es aún menor que la del $O_2^{\bullet-}$. A diferencia de este, el H_2O_2 puede atravesar las membranas biológicas por difusión pasiva. Su importancia desde el punto de vista de la inducción de daño oxidativo radica en su participación en la generación del HO^{\bullet} . En condiciones fisiológicas, la célula mantiene la concentración en estado estacionario de H_2O_2 en el rango de 1×10^{-7} a 1×10^{-8} M, a través de su detoxificación por acción de la catalasa en los peroxisomas y de la glutatión peroxidasa (GPx) citosólica (Cadenas y Davies, 2000).

El HO^{\bullet} es la especie química más reactiva de las especies activas del O_2 . Su tiempo de vida media se encuentra en el orden de los nanosegundos, y posee un alto potencial de reducción ($E^\circ = 2,00$ V) (Koppenol, 2001). Dada su extrema reactividad, esta especie reacciona inmediatamente con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases nitrogenadas del ADN y ácidos orgánicos, en las proximidades del lugar donde es generado. Como consecuencia, el HO^{\bullet} puede producir daño oxidativo la ADN, proteínas, inactivar enzimas e iniciar procesos de peroxidación lipídica.

El concepto de que el HO^{\bullet} podría ser generado a través de la reacción entre el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 fue propuesto inicialmente por Fritz Haber y Joseph Weiss, en 1934. Al describirse al $O_2^{\bullet-}$ como un metabolito celular, rápidamente se reconoció que la reacción de Fenton [3] podría ser un mecanismo de generación de especies radicales tóxicas, relevantes desde el punto de vista fisiológico (Kehrer, 2000).



La reacción de Haber-Weiss resulta termodinámicamente desfavorable en sistemas biológicos, y requiere de un catalizador para que pueda ocurrir a velocidades relevantes. Las especies que pueden actuar como tales son frecuentemente los metales de transición (como el Fe, Cu y Cr), según la siguiente secuencia de reacciones:



Siendo la reacción neta:



La reacción anterior es considerada actualmente como el principal mecanismo a través del cual el HO[•] es generado en los sistemas biológicos (Liochev, 1999).

4.2.3. ESPECIES ACTIVAS DEL N₂

El NO es la principal especie activa derivada del N₂. Resulta de la combinación de un átomo de N con 3 electrones desapareados, con un átomo de O con 2 electrones no apareados. De esta manera, se forma una molécula que posee un electrón desapareado, constituyendo un radical libre centrado en el N. A pesar de esto, el NO es una especie relativamente estable, encontrándose su tiempo de vida media en el orden de los segundos (Knowles y Moncada, 1992). Al ser una molécula no polar, el NO tiene la capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas, favoreciendo su difusión.

El NO se produce en células de mamíferos a través de una reacción catalizada por miembros de la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS), que catalizan la oxidación de la L-arginina y NADPH para producir L-citrulina y NO [7].



Se han identificado tres isoformas de NOS. Dos de ellas presentan expresión constitutiva, la NOS neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y la tercera corresponde a una isoforma inducible (iNOS), característica de macrófagos (Masters, 2000). Además, se ha descrito la presencia de una NOS asociada a la membrana interna mitocondrial (mtNOS) de expresión constitutiva y regulada por Ca²⁺ (Giulivi, 2003).

El NO desempeña un rol central en la regulación de la presión arterial. Es producido en el endotelio y es capaz de difundir al músculo liso que rodea a los vasos sanguíneos, donde actúa principalmente como modulador positivo de la guanilato ciclasa, favoreciendo la síntesis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). La GMPc induce la captación de Ca²⁺ por el retículo endoplasmático, conduciendo finalmente a la relajación del músculo liso y consecuente vasodilatación (Ignarro y col., 1987). Por otro lado, el NO es también un importante regulador de la respiración mitocondrial (Boveris y col., 2009).

A pesar de que el NO es una especie química de baja reactividad, los aumentos en su concentración en estado estacionario por sobre los niveles fisiológicos pueden producir efectos perjudiciales para las células. Estos dependen, en realidad, de la formación de intermediarios más reactivos, como el peroxinitrito (ONOO⁻) y el radical nitrosilo (NO₂[•]) (Radi y col., 2000).

El ONOO^- se forma a partir de la reacción entre el NO con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ [8].



El ONOO^- es una especie no radicalaria altamente reactiva, capaz de oxidar y nitrar moléculas, o descomponerse generando otras especies, como el NO_2^\bullet . La reacción de formación del ONOO^- es extremadamente rápida, encontrándose su constante de velocidad en el orden de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La producción de esta especie activa del N_2 constituye la vía principal del metabolismo del NO (60-70 %), mientras que representa sólo un 15 % de la utilización del $\text{O}_2^{\bullet-}$ total (Radi, 2013).

4.2.4. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Existen diversos sistemas de defensa antioxidantes encargados de metabolizar a las especies activas del O_2 . Las defensas antioxidantes se pueden diferenciar en enzimáticas y no enzimáticas. Las últimas, a su vez, se agrupan en hidrosolubles y liposolubles.

4.2.4.1. DEFENSAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

4.2.4.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La SOD cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 [9] con una constante de velocidad cercana al límite difusional, de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



La SOD tiene un comportamiento no michaeliano, por lo que no es saturable por sustrato. Existen tres isoformas conocidas en mamíferos: la Cu,Zn-SOD citosólica, la Mn-SOD mitocondrial y la Cu,Zn-SOD extracelular (EC-SOD). La primera tiene un peso molecular de 32 kDa y está formada por dos subunidades, cada una de las cuales posee un átomo de Cu^{2+} y uno de Zn^{2+} en su sitio activo. La segunda, ubicada en la mitocondria, posee un peso molecular de 40 kDa y está compuesta por cuatro subunidades, con un átomo de Mn^{2+} por subunidad (Beauchamp y Fridovich, 1973). La EC-SOD se encuentra mayoritariamente anclada a la matriz extracelular, especialmente en la circundante a los vasos sanguíneos, excepto por una fracción soluble minoritaria presente en circulación (Petersen y col., 2010).

4.2.4.1.2. CATALASA

La catalasa metaboliza el H_2O_2 a H_2O y O_2 [10] en una reacción que presenta una constante de velocidad de $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



Al igual que para la SOD, esta reacción sigue una cinética no michaeliana por lo que no es saturable a las concentraciones usuales de H_2O_2 encontradas en sistemas biológicos. La catalasa es una proteína compuesta por cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe (III)-protoporfirina) en su sitio activo. Su peso molecular es de 240 kDa y se encuentra casi exclusivamente en los peroxisomas (Chance y col., 1979).

4.2.4.1.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

La GPx cataliza la reacción entre distintos hidroperóxidos (ROOH) con el glutatión reducido (GSH), para formar glutatión oxidado (GSSG) y el producto de reducción del hidroperóxido (ROH) [11].



La GPx es específica para el GSH, e inespecífica para el hidroperóxido metabolizado. Existen varias isoformas de la GPx, que difieren en el tejido en el que se expresan y en la presencia o no de selenio (Se) en su sitio activo. Las GPx Se-dependientes poseen un peso molecular de 76 kDa y están compuestas por cuatro subunidades (con un átomo de Se por subunidad). Las GPx Se-independiente presentan dos subunidades y un peso molecular de 46 kDa. La distribución subcelular de esta enzima es complementaria a la de la catalasa: dos tercios de la cantidad total de la GPx se encuentran en el citosol y un tercio en la mitocondria. A pesar de que ambas enzimas son responsables de la detoxificación del H_2O_2 , la catalasa actuaría principalmente a altas concentraciones de H_2O_2 mientras que la GPx lo hace a bajas concentraciones del mismo, debido a que tienen diferentes constantes de afinidad por este sustrato (Flohé y col., 1973).

4.2.4.2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICAS HIDROSOLUBLES

4.2.4.2.1. GLUTATIÓN

El GSH es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Presenta una unión γ peptídica entre el glutamato y la cisteína, la cual se encuentra unida a la glicina por una unión peptídica convencional (Figura 6).

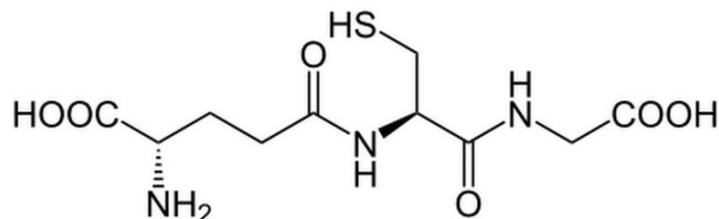


Figura 6. Estructura química del GSH.

El GSH se encuentra en altas concentraciones en las células de los mamíferos (en el orden de 1-5 mM), lo que lo ubica como el tiol no proteico más importante en tejidos animales. Se localiza

principalmente en el citoplasma y participa en una gran cantidad de funciones celulares que derivan de su capacidad para mantener los grupos tioles proteicos en estado reducido. Para ello, actúa como un dador de electrones, convirtiéndose en el proceso en su forma oxidada (GSSG). El GSH tiene, además, funciones antioxidantes *per se*, dado que reacciona en forma directa con las especies activas del O_2 como el $O_2^{\cdot-}$, el HO^{\cdot} y el 1O_2 (Winterbourn y Metodiewa, 1994). El producto final de la oxidación del GSH es el GSSG, el cual es regenerado dentro de las células por medio de una reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH (Figura 7).

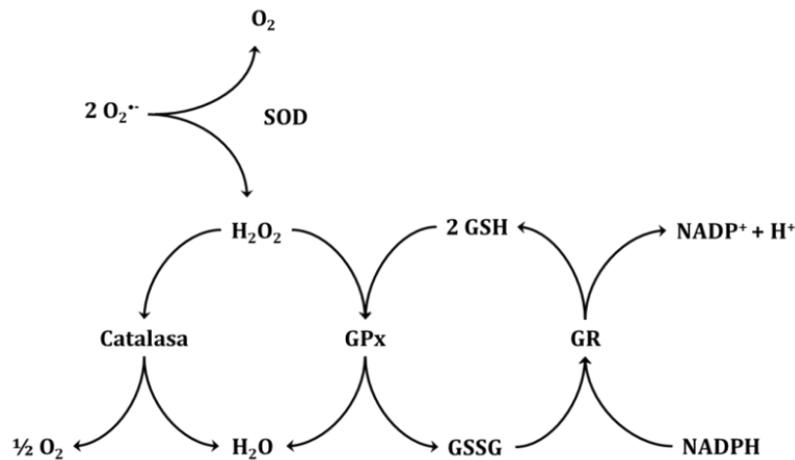


Figura 7. Interrelación entre las principales defensas antioxidantes de alto y bajo peso molecular en sistemas biológicos.

4.2.4.2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico es un compuesto hidrosoluble que cuenta con dos hidrógenos ácidos, cuyos valores de pKa son 4,20 y 11,80. Por lo tanto, a pH fisiológico, se encuentra como el anión monovalente denominado ascorbato (Figura 8).

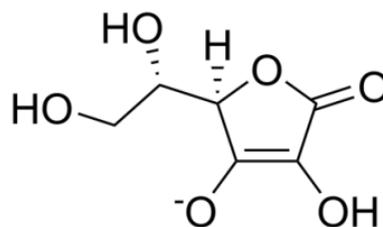


Figura 8. Estructura química del anión ascorbato a pH fisiológico.

La mayor parte de los radicales libres generados en sistemas biológicos pueden conducir a la oxidación del ascorbato por un solo electrón, para formar el radical ascorbilo. Además, el ascorbato es capaz de actuar como dador de dos electrones, formando dehidroascorbato como producto final de la oxidación. Dado su bajo potencial estándar de reducción ($E^{\circ} = 0,3 \text{ V}$), el ascorbato es un atrapador de especies activas del O_2 como el radical peroxilo (ROO^{\cdot}), HO^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$ y 1O_2 (Rice, 2000). Si bien las reacciones en las que participa el ascorbato ocurren en fase acuosa, puede regenerar al α -tocoferol por reacción

con los radicales α -tocoferilo, por lo que es relevante también en las reacciones que ocurren en medios liposolubles (Packer y col., 1979).

El ascorbato y el GSH son los antioxidantes de bajo peso molecular más abundantes en los mamíferos. Ambos cumplen funciones complementarias, dado que el consumo de uno de ellos podría ser compensado por la presencia del otro. Además, se ha descrito que pueden actuar como par redox en distintos sistemas biológicos (Winkler y col., 1994).

4.2.4.3. DEFENSAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICAS LIPOSOLUBLES

Los antioxidantes no enzimáticos liposolubles más importantes en sistemas biológicos incluyen al α -tocoferol, la ubiquinona y los carotenoides. Estas moléculas tienen en común la presencia de largas cadenas hidrocarbonadas en su estructura, lo que les confiere su carácter hidrofóbico. Su principal función como defensa antioxidante radica en la capacidad que poseen estas moléculas de inhibir la propagación de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica (Burton e Ingold, 1981).

4.2.5. FUENTES DE PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES ACTIVAS DEL O₂ EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Además de las reacciones tipo Fenton catalizadas por los metales de transición, y de la actividad de las NOX de relevancia en procesos inflamatorios, la mitocondria es una de las principales fuentes de producción de especies activas del O₂ durante la respiración celular y en diversas situaciones fisiopatológicas.

4.2.5.1. ESTRUCTURA MITOCONDRIAL

La mitocondria es una organela compleja que se encuentra en el citoplasma de casi todas las células eucariotas. Está compuesta por dos membranas, una externa y una interna, separadas por el espacio intermembrana (Figura 9). La membrana externa se encuentra en contacto con el citoplasma de la célula, rodeando a la organela, y es permeable a una gran cantidad de iones y metabolitos de tamaño menor a 5 kDa. La membrana interna es impermeable a la mayoría de las moléculas e iones, incluyendo a los H⁺. Esta membrana es la de mayor contenido proteico en la naturaleza, y está compuesta por un 80% de proteínas y sólo un 20% de lípidos. La superficie de la membrana interna se encuentra aumentada debido a la presencia de un gran número de invaginaciones, llamadas crestas, que sobresalen hacia el interior de la organela, denominado matriz mitocondrial (Nelson y Cox, 2006).



Figura 9. Esquema de la estructura mitocondrial.

En la membrana interna mitocondrial es característica la presencia de un fosfolípido en particular, compuesto por cuatro ácidos grasos, llamado cardiolipina (Figura 10). Éste presenta dos fosfatidilglicerolos enlazados a una molécula de glicerol, dando un total de cuatro ácidos grasos por molécula de cardiolipina. En condiciones fisiológicas, sólo uno de los grupos fosfatos se encuentra protonado mientras que el otro forma un puente de hidrógeno con el grupo 2'-hidroxilo del glicerol. De esta manera, la cardiolipina presenta una estructura resonante bicíclica en la membrana interna mitocondrial (Haines y Dencher, 2002).

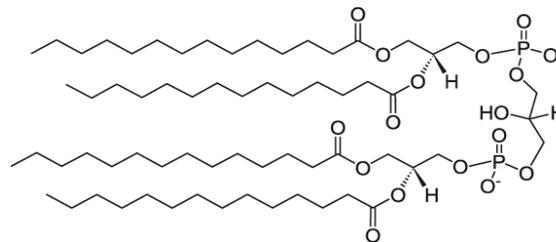


Figura 10. Estructura química de la cardiolipina.

Gran parte de las proteínas localizadas en la membrana interna son transportadores de membrana, tales como los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial (Complejos I, III y IV), la F_0-F_1 ATP sintasa (Complejo V) y la ADP-ATP translocasa. Estos grandes complejos proteicos se encuentran íntimamente relacionados con la principal función de esta organela: la síntesis de ATP. Exceptuando a la succinato deshidrogenasa (Complejo II), que está unida a la cara interior de la membrana interna (cara-N), todas las enzimas responsables del ciclo de Krebs se encuentran solubles en la matriz. Dentro de este compartimento altamente concentrado también se encuentran otras enzimas metabólicas, ribosomas, cationes y metabolitos diversos (Nelson y Cox, 2006).

4.2.5.2. LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

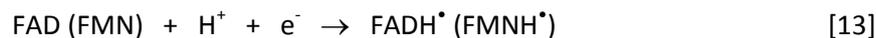
La cadena respiratoria mitocondrial consiste en una serie de proteínas integrales y asociadas a la membrana interna mitocondrial, que se encuentran agrupadas en grandes complejos proteicos. Su principal característica radica en su capacidad de aceptar y ceder electrones. Los complejos que

conforman la cadena respiratoria mitocondrial son: la NADH deshidrogenasa (NADH ubiquinona oxidoreductasa o Complejo I), la succinato deshidrogenasa (Complejo II), la citocromo *c* reductasa (ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa o Complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (Complejo IV). Estos complejos se encuentran física y funcionalmente asociados en la membrana interna, permitiendo su ordenamiento de forma secuencial, lo que facilita la transferencia de electrones entre ellos y determina una alta velocidad y eficiencia del sistema (Nicholls y Ferguson, 2002).

Además de estos complejos macromoleculares, existen moléculas orgánicas de estructura química más simple con la capacidad de transferir electrones. Entre ellas se encuentran el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺), el mononucleótido de flavina (FMN), el dinucleótido de flavina adenina (FAD) y la ubiquinona (UQ). El NAD⁺ es un aceptor de electrones hidrosoluble, asociado de forma reversible a muchas deshidrogenasas, que es capaz de transferir dos electrones produciendo NADH [12].



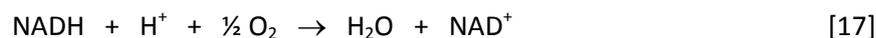
Los nucleótidos de flavina se encuentran estrechamente asociados a flavoproteínas como grupos prostéticos, y pueden aceptar ya sea un electrón, generando las formas semiquinonas FADH[•] o FMNH[•] [13], o dos, produciendo FADH₂ o FMNH₂ [14].



Por su parte, la UQ actúa como transportador de electrones en el entorno hidrofóbico de la membrana interna mitocondrial, aceptando un electrón para dar la forma ubisemiquinona UQH[•] [15], o dos, produciendo ubiquinol (UQH₂) [16].



La fuerza directriz que gobierna la transferencia de electrones a través los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial es el potencial de reducción estándar de cada uno de ellos, que depende de las concentraciones de sus formas oxidadas y reducidas, a un determinado pH. El último aceptor de la cadena de electrones es el O₂, el cual es reducido a H₂O en el Complejo IV. De esta manera, la reacción neta de la cadena respiratoria mitocondrial es la transferencia de dos pares de electrones desde el NADH al O₂ [17].



El flujo espontáneo de electrones desde los complejos con menor potencial de reducción hacia los de mayor potencial de reducción es un proceso exergónico que aporta la energía suficiente para realizar un proceso endergónico simultáneo: el bombeo de H⁺ desde la matriz hacia el espacio intermembrana. Esto ocurre de manera vectorial, a través de los Complejos I, III y IV (Nicholls y

Ferguson, 2002). De esta manera, se genera un gradiente de H^+ que polariza la membrana interna, siendo positivo (P) hacia el espacio intermembrana y negativo (N) hacia la matriz mitocondrial (Figura 11). Un total de diez H^+ son transportados por cada par de electrones transferido desde el NADH al O_2 , mientras que seis H^+ son transportados por cada par de electrones transferido desde el succinato al O_2 .

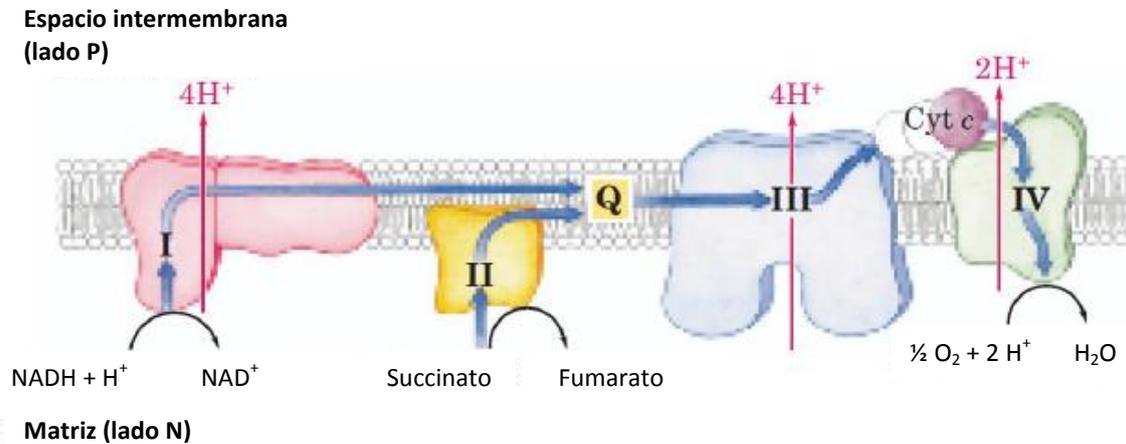
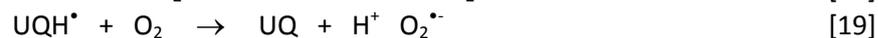


Figura 11. Flujo de electrones y protones a través de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (adaptado de Nelson y Cox, 2006).

4.2.5.3. LA PRODUCCIÓN DE $O_2^{\bullet-}$ MITOCONDRIAL

La cadena respiratoria mitocondrial posee dos fuentes principales de generación de $O_2^{\bullet-}$: el Complejo I y el Complejo III (Turrens y Boveris, 1980). En el Complejo I, el $O_2^{\bullet-}$ se produce a través de la transferencia de un electrón al O_2 durante la autooxidación de la FMNH $^{\bullet}$ de la NADH deshidrogenasa [18]. En el Complejo III ocurre un proceso similar, siendo la UQH $^{\bullet}$ quien transfiere el electrón al O_2 [19].



En condiciones fisiológicas, el Complejo I contribuye aproximadamente con un tercio de la producción mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$, mientras que el Complejo III lo hace con dos tercios (Grivennikova y Vinogradov, 2006). La mayor parte del $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial es liberado a la matriz, aunque está descrito que hasta un 30% del mismo puede ser liberado al espacio intermembrana (Han y col., 2001). Este $O_2^{\bullet-}$ ha sido reconocido, además, como el precursor del H_2O_2 producido en la mitocondria (Boveris y Cadenas, 1997).

4.2.5.4. LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Más allá de su rol central en la producción de especies activas del O_2 , con frecuencia se denomina a la mitocondria como la maquinaria energética de la célula dado su papel predominante en la producción de ATP. Este proceso, conocido como fosforilación oxidativa, comprende reacciones de óxido-reducción entre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, que se encuentran

acopladas a la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa comienza con la transferencia de electrones desde las deshidrogenasas del ciclo de Krebs hacia los complejos de la cadena respiratoria, continúa con el pasaje de los mismos a través de estos transportadores redox de acuerdo con su potencial de reducción, y finaliza en el Complejo IV, donde el O_2 se reduce a dos moléculas de H_2O al aceptar un total de cuatro electrones.

En total, la caída del potencial redox a través de la cadena respiratoria es de aproximadamente 1100 mV. La diferencia resultante en la concentración de protones en la matriz y la separación de cargas positivas a los lados de la membrana interna representa la mayor parte de la energía obtenida de esta transferencia de electrones, que es conservada como energía electroquímica. La energía almacenada en este gradiente, denominada fuerza protón motriz (FPM), tiene dos componentes: a) la energía química potencial debida a la diferencia en la concentración de H^+ en las dos regiones separadas por la membrana interna mitocondrial [gradiente de pH (ΔpH)]; y b) la energía potencial eléctrica que resulta de la separación de cargas, cuando un H^+ se mueve a través de la membrana sin un contraíón [potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)]. La FPM se expresa en mV y su valor máximo alcanzado a través de la membrana mitocondrial interna es de 180-220 mV.

Dado que la membrana interna mitocondrial es altamente impermeable, la vía predominante de reingreso de los H^+ hacia la matriz es un poro asociado a la enzima F_0-F_1 ATP sintasa. Este gran complejo proteico se sitúa en la cara interna de la membrana interna mitocondrial y está formado por dos subunidades: la F_1 , un complejo de proteínas periférico de membrana con la función de sintetizar ATP; y la F_0 , anclada a la membrana, sensible a la inhibición por oligomicina y compuesta por proteínas integrales de membrana que forman el transportador de H^+ . A través de la subunidad F_0 , se genera un flujo exergónico de H^+ desde el lado P hacia el lado N de la membrana interna, el cual está acoplado a la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico en la subunidad F_1 . De esta manera, el bombeo de H^+ conjuntamente con la síntesis de ATP genera un circuito de H^+ que es de vital importancia para la bioenergética mitocondrial y tisular.

La eficiencia de la síntesis de ATP se encuentra regulada por diversos mecanismos, como la naturaleza del sustrato que llega a la cadena respiratoria y el acoplamiento entre la transferencia de electrones y el bombeo de H^+ al espacio intermembrana. Además, el potencial escape de H^+ a través de la membrana interna mitocondrial, cuando esta se encuentra dañada, también puede influir sobre la eficiencia de este proceso. Por lo tanto, cualquier alteración en los complejos de la cadena respiratoria, en el gradiente electroquímico de H^+ a lo largo de la membrana interna, o en la actividad de la F_0-F_1 ATP sintasa, puede llevar a una deficiencia de la producción de ATP resultado en una disfunción bioenergética e insuficiencia orgánica (Nicholls y Ferguson, 2002). Específicamente en el corazón, la contracción y relajación cardíaca requiere un suministro de energía continuo, dado que este órgano consume más energía que cualquier otro. Se ha observado en humanos una disminución en los niveles de fosfatos de alta energía debido a alteraciones en el equilibrio entre el suministro y demanda de ATP

durante la insuficiencia cardíaca (Beer y col., 2002), interfiriendo en la correcta transferencia de la energía química producida por la mitocondria en trabajo contráctil (Neubauer, 2007).

4.2.6. CAMBIOS EN LA MITOCONDRIA POR LA EXPOSICIÓN AL MP

Se ha observado que, luego de ser inhalado, el MP se acumula principalmente en las vacuolas (Figura 12A y 12B) y mitocondrias (Figuras 12C y 12D) de los macrófagos alveolares, induciendo alteraciones estructurales evidentes en esta última organela (Li y col., 2003).

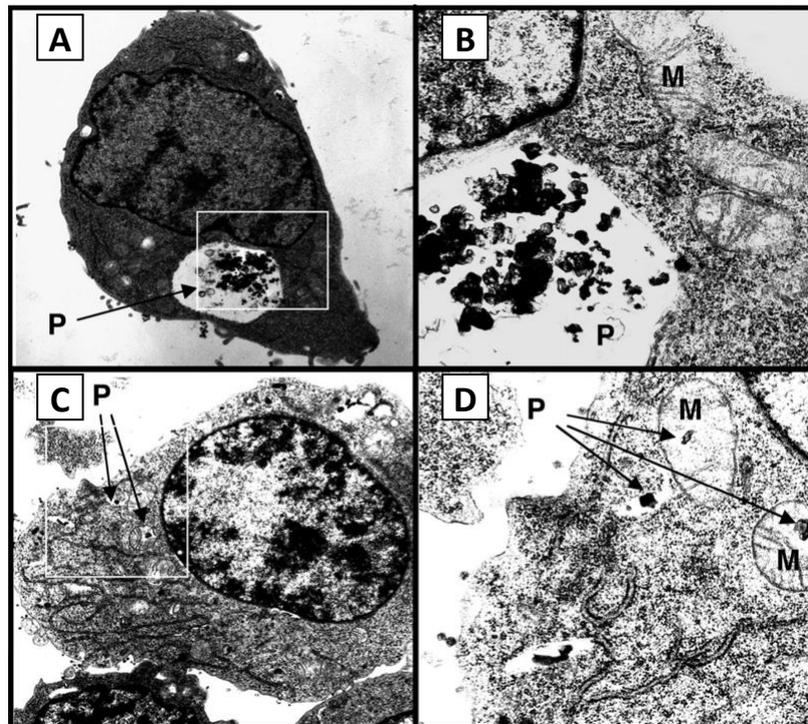


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión en muestras de la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 incubados *in vitro* con MP durante 16 h. Luego de ser internalizadas, (A y B) las partículas (P) tienden a acumularse en las vacuolas y (C y D) en las mitocondrias (M) del macrófago (adaptado de Li y col., 2003).

Por esta razón, se ha sugerido que una alteración de la función mitocondrial podría contribuir, junto con la producción directa de radicales libres a cuenta de los distintos componentes activos del MP, y de la activación de las NOX, al estrés oxidativo local observado luego de una exposición al MP. De hecho, se ha mostrado que una instilación intranasal con ROFA induce cambios en el metabolismo del O₂ en el pulmón de ratón a través de la activación de las NOX y de cambios en la funcionalidad mitocondrial (Magnani y col., 2011 y 2013).

4.3. LA EXPOSICIÓN AL MP Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Numerosos estudios muestran la ocurrencia de una respuesta inflamatoria, primero a nivel local y luego sistémica, producto de la inhalación de MP (Brook y col., 2010). Una observación frecuente en relación a la exposición al MP es la infiltración de células inflamatorias en el pulmón, tanto en humanos

(Ghio y col., 2000) como en modelos animales (Ghio y Huang, 2004). Esta situación se acompaña de la liberación de citoquinas proinflamatorias a nivel local, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleuquina (IL)-6, las cuales son capaces de traslocar a circulación periférica (van Eeden y col., 2005; Kido y col., 2011). Sin embargo, el efecto del MP a nivel sistémico, así como el de los mediadores inflamatorios liberados luego de su inhalación sobre el sistema cardiovascular, no se conocen en detalle.

4.3.1. GENERALIDADES DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

La función central del sistema inmune es la de responder frente a lesiones o infecciones. Esta respuesta inmune es una reacción desplegada por el organismo, tanto frente a microorganismos como a distintos compuestos químicos reconocidos como extraños, independientemente de la consecuencia que pueda acarrear dicho proceso (Abbas y col., 2012). Esta reacción implica la activación de mecanismos de defensa ya instaurados, denominados en su conjunto inmunidad innata; así como de diversos componentes que aparecen en respuesta a la presencia de lo reconocido como extraño y se adaptan a ella, por lo que se los denomina inmunidad adaptativa.

La primera línea de defensa del sistema inmune se da a través de las reacciones correspondientes a la inmunidad innata, mientras que las respuestas posteriores suelen estar a cargo de la inmunidad adaptativa. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas (como los epitelios y las sustancias formadas en sus superficies), las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y linfocitos NK), proteínas de la sangre (factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación) y las citoquinas. Por su parte, los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos. Los mecanismos con los que cuenta la inmunidad innata son específicos para estructuras comunes compartidas entre los compuestos reconocidos como extraños, aunque su diversidad es muy limitada. En cambio, las principales características de la inmunidad adaptativa son las de reconocer con alta especificidad una gran diversidad de antígenos, así como la capacidad de “recordar” las exposiciones repetidas a los mismos para responder cada vez con mayor eficacia (memoria).

4.3.2. CARACTERÍSTICAS DEL RECONOCIMIENTO EN LA INMUNIDAD INNATA

Los componentes de la inmunidad innata reconocen una cantidad limitada de estructuras presentes exclusivamente en virus y bacterias, entre las que se destacan: ácidos nucleicos (como el ARN bicatenario y las secuencias de ADN CpG sin metilar), proteínas iniciadas en N-formilmetionina, lípidos e hidratos de carbono complejos y oligosacáridos ricos en manosa, entre otros. En su conjunto, estas moléculas reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Los receptores que se unen a estos PAMPs se conocen como receptores para el reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*), y se expresan sobre la superficie de diversos tipos celulares (como los neutrófilos, macrófagos, células

dendríticas y endoteliales), en su interior o son proteínas solubles presentes en sangre y otros líquidos extracelulares. La activación de estos receptores desencadena vías de transmisión de señales que induce diversas respuestas en estas células, como la producción de citoquinas (Abbas y col., 2012).

Los PRR incluyen los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptor*), tipo NOD (NLRs, del inglés *NOD-like receptor*), las lectinas de tipo C, los receptores de manosa, de glucanos y *scavenger*, entre otros. Los TLRs ocupan un lugar central entre los PRR, dado que reconocen un espectro relativamente amplio de moléculas diferentes y aportan cierta variabilidad a los tipos de respuestas inflamatorias que se inducen tras su activación, según el uso de distintas proteínas adaptadoras. Además, representan una parte importante en el vínculo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Se han descrito hasta el momento 13 TLRs en humanos, denominados TLR1 a TLR13. Los TLRs son proteínas transmembrana que reconocen diversas estructuras extrañas para los mamíferos, entre las que se destacan: el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, los peptidoglucanos de las bacterias Gram positivas, las lipoproteínas bacterianas y el ácido lipoteicoico, entre muchos otros. Dado que algunas de estas endotoxinas se han encontrado en muestras de MP, sobre todo en las partículas gruesas (Heinrich y col., 2003), se ha sugerido que estos receptores desempeñan algún rol en el reconocimiento del MP por el sistema inmune, en particular por las isoformas TLR2 y TLR4 (Shoenfelt y col., 2009). Al reconocer a un ligando, los TLRs activan factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B), que a su vez estimula la expresión de genes que codifican para moléculas implicadas en la respuesta inmune innata, como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión endoteliales. Además de los PAMPs, los TLR pueden reconocer epitopes de moléculas endógenas que han sido modificadas por daño tisular como consecuencia de, por ejemplo, la ocurrencia de estrés oxidativo. En su conjunto, se los reconoce como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular patterns*). Se ha postulado que estos compuestos también podrían desempeñar un rol en la activación de la inmunidad innata en respuesta a la exposición al MP (Miyata y van Eeden, 2011).

Otro tipo de receptor potencialmente involucrado en el reconocimiento del MP por el sistema inmune innato es aquel denominado *scavenger* (Kobzik, 1995). Estos receptores reconocen principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas por oxidación o acetilación, así como ligandos con múltiples cargas negativas.

4.3.3. ATRACCIÓN DE LEUCOCITOS HACIA EL FOCO INFLAMATORIO

En respuesta a un daño tisular, los neutrófilos y monocitos migran desde la sangre hacia el foco inflamatorio a través de una compleja secuencia de eventos que involucra la acción conjunta de moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales, citoquinas y factores quimiotácticos (Figura 13). Este proceso se conoce como extravasación de leucocitos y es de vital importancia para el montaje de una adecuada respuesta inmune al daño tisular (Abbas y col., 2012).

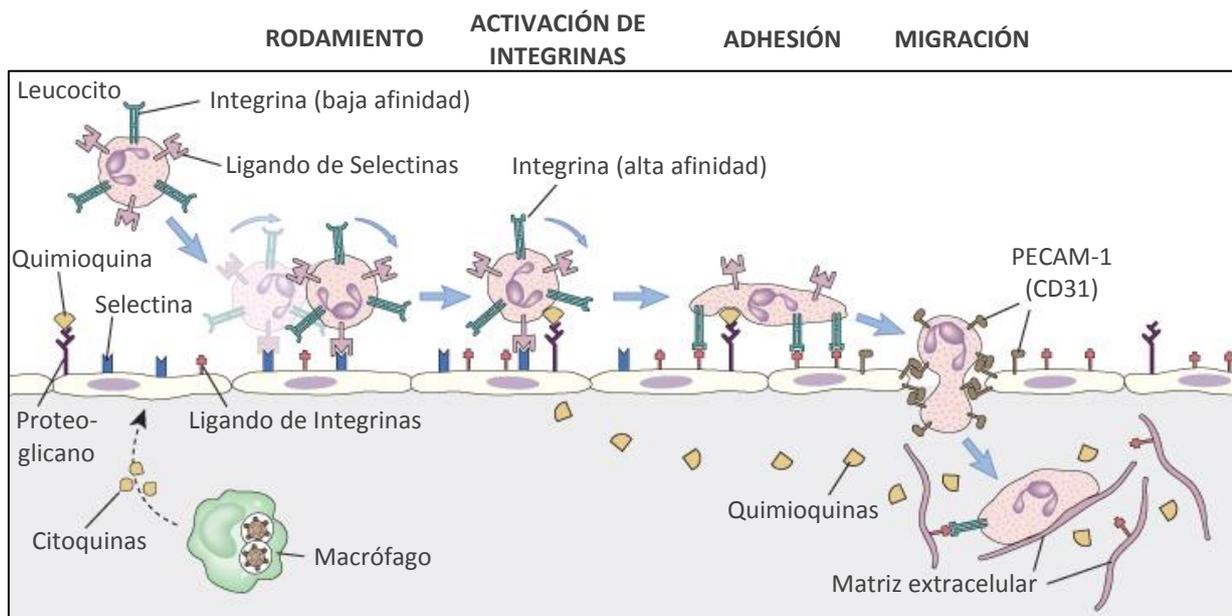


Figura 13. Esquema del proceso de atracción de leucocitos hacia el foco inflamatorio (adaptado de Abbas y col., 2012).

El primer paso de la extravasación de leucocitos implica la inducción de la expresión de proteínas denominadas selectinas (P-Selectina y E-Selectina en el endotelio, y L-Selectina en leucocitos), en respuesta a las citoquinas liberadas por las células inflamatorias que han sido activadas por la injuria del tejido. Las citoquinas involucradas en este proceso son principalmente el $\text{TNF-}\alpha$ y la IL-1. Estas interacciones entre las selectinas y sus ligandos son de baja afinidad, disociándose fácilmente por la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo. En consecuencia, los leucocitos se desprenden y vuelven a unir repetidas veces, observándose el rodamiento de los mismos a lo largo de la superficie del endotelio.

En respuesta a la producción inicial de citoquinas proinflamatorias, se liberan también citoquinas quimiotácticas denominadas quimioquinas, principalmente desde las células endoteliales y los macrófagos tisulares activados. Un representante importante de esta familia es la proteína quimioattractante de monocitos (MCP)-1. Su principal función es la de favorecer la quimiotaxis a través de la inducción de un aumento en la afinidad de otro tipo de moléculas de adhesión leucocitarias, las integrinas. Estas proteínas se encuentran en un estado de baja afinidad en células inactivas, de forma tal que son ineficientes como factores de adhesión. Por acción de las quimioquinas, las integrinas sufren un cambio de conformación y agregación en las membranas, lo que aumenta significativamente la avidéz de unión entre los leucocitos y el endotelio.

Las citoquinas liberadas en el foco inflamatorio también inducen a la expresión endotelial de los ligandos de las integrinas, en especial de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y de la molécula de adhesión de las células vasculares 1 (VCAM-1). La interacción entre estas proteínas promueve la adhesión firme de los leucocitos al endotelio, la reorganización de su citoesqueleto y su expansión sobre la superficie endotelial.

El último paso de la atracción de leucocitos al foco inflamatorio es la trans migración de los mismos a través del endotelio. Este proceso se encuentra favorecido por la acción de las quimioquinas sobre los leucocitos adheridos, estimulando la migración a través de los espacios intercelulares según un gradiente de concentración.

La acumulación de los leucocitos en los tejidos representa un componente central de la respuesta inflamatoria, la cual tiene cierta especificidad según la expresión de distintas combinaciones de moléculas de adhesión y receptores de factores quimiotácticos en las distintas subpoblaciones de leucocitos. De esta manera se observa, por lo general, una atracción inicial de neutrófilos (en un plazo entre horas y días), seguida del reclutamiento de monocitos (entre días y semanas después) al foco de inflamación (Abbas y col., 2012).

4.3.4. ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS

Una vez que se encuentran en el foco de inflamación, los neutrófilos y macrófagos internalizan a los patógenos y partículas que dieron origen a la respuesta inflamatoria, mediante la fagocitosis en vesículas mediada por receptores. Cuando esto ocurre, los receptores involucrados en dicho proceso activan cascadas de señalización intracelulares que activan a estos leucocitos para eliminar el agente extraño. Esto implica la inducción de la expresión de varias enzimas proteolíticas, así como un aumento en la producción de especies activas del O_2 y del N_2 (estallido respiratorio), y de más citoquinas y factores quimiotácticos.

En leucocitos activados, el principal sistema que conduce a la generación de especies activas del O_2 son las NOX. Esta familia de enzimas están formadas por múltiples subunidades que, al ser activadas, se ensamblan en la membrana del fagosoma y producen $O_2^{\bullet -}$ [1]. Como se enunció anteriormente, el $O_2^{\bullet -}$ producido por las NOX puede ser metabolizado por la SOD, produciendo H_2O_2 [9]. Este producto es utilizado por otra enzima presente en los fagosomas, la mieloperoxidasa (MPO), para producir ácidos hipohalogenosos de poderosa actividad microbicida, como el HClO [20].



Además de las especies activas del O_2 , los neutrófilos y macrófagos activados producen especies activas del N_2 como el NO por acción de la iNOS. A su vez, el NO puede combinarse con el $O_2^{\bullet -}$ producido por las NOX para generar cantidades significativas de $ONOO^-$ [8].

Todos estos productos oxidantes son altamente inespecíficos, de modo que no distinguen entre estructuras propias y ajenas del huésped. Por consiguiente, pueden provocar una lesión tisular en el intento de hacer frente a la presencia del agente reconocido como extraño.

5. INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN AL MP

Además de lo observado a nivel local, estudios realizados en humanos han relacionado las exposiciones agudas al MP con incrementos en los niveles plasmáticos de diversas citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) (van Eeden y col., 2001; Riediker, 2007; Calderón-Garcidueñas y col., 2008), y de marcadores circulantes de daño oxidativo a macromoléculas (Sørensen y col., 2003; Bräuner y col., 2007). Estas observaciones indican que la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo inducidos por la exposición al MP excede los límites del pulmón, extendiéndose de forma significativa a nivel sistémico, y desempeñando potencialmente un rol relevante en los efectos adversos observados sobre el sistema cardiovascular (Brook y col., 2010). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos involucrados en los eventos tempranos que conducen a estas observaciones, así como de la cinética de la respuesta inflamatoria y del estrés oxidativo local y sistémico inducidos por la exposición al MP. Tampoco se encuentra totalmente dilucidado el alcance que puede tener esta respuesta inflamatoria sobre el sistema cardiovascular, ni su relación con la función cardíaca y con la incidencia y progresión de las principales afecciones relacionadas con la exposición al MP, como el IAM.

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL

La hipótesis de la investigación planteada es que la exposición a contaminantes ambientales particulados induce alteraciones funcionales a nivel cardíaco, que estarían mediadas por un síndrome inflamatorio y estrés oxidativo que se produce en primer lugar en el pulmón y luego se extiende a nivel sistémico, y cuyas consecuencias están asociadas a la aparición y progresión de las principales afecciones cardiovasculares reportadas.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el metabolismo oxidativo y energético cardíaco, y su relación con la función contráctil, luego de una exposición aguda a MP y utilizando distintos acercamientos tanto *in vivo* como *in vitro*. Asimismo, se plantea estudiar la cinética de liberación de los principales mediadores prooxidantes y proinflamatorios involucrados en este contexto, así como los mecanismos inflamatorios activados en este proceso y sus alcances e implicancias sobre el sistema cardiovascular.

La verificación de la hipótesis se realizó en un modelo de exposición aguda a MP en ratones, realizada por instilación intranasal de una suspensión de ROFA (1 mg/kg peso corporal). También se emplearon protocolos de exposición *in vitro* en distintos aislamientos y cultivos celulares.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. CAPÍTULO I

Evaluación del metabolismo oxidativo y energético cardíaco luego de una exposición aguda a ROFA: Rol de la mitocondria y consecuencias sobre la función contráctil.

2.2. CAPÍTULO II

Cinética de la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica luego de una exposición aguda a ROFA: Rol de la activación intravascular de leucocitos polimorfonucleares.

2.3. CAPÍTULO III

Estudio de la respuesta inflamatoria local y sistémica luego de una exposición aguda a ROFA: Rol de los monocitos e implicancias sobre la progresión del IAM.

2.4. CAPÍTULO IV

Evaluación *in vitro* de los mecanismos involucrados en la activación de células mieloides y endoteliales luego de una exposición aguda a ROFA.

2.5. CAPÍTULO V

Efecto de la inhibición de la respuesta inflamatoria dependiente de TNF- α sobre las alteraciones cardíacas observadas luego de una exposición aguda a ROFA.

1. Modelos experimentales: exposición a partículas de contaminación ambiental

1.1. Modelo de partículas de contaminación ambiental

Se utilizaron muestras de MP proveniente de la combustión de residuos fósiles (fueloil No.6 reducido en azufre), conocido como ROFA. Las mismas fueron recolectadas de las emisiones de la Central Eléctrica Mystic (Boston Edison Co., Mystic, CT, Estados Unidos) y han sido provistas amablemente por el Dr. John Godleski (Harvard School of Public Health, Harvard University, Boston, MA, Estados Unidos).

El MP proveniente de la utilización de este tipo de combustible ha sido extensamente caracterizado en cuanto a su composición química y tamaño de partícula (Chen y col., 2004; Huggins y col., 2011; Pattanaik y col., 2012). Específicamente, las muestras de ROFA utilizadas en este trabajo de tesis presentan un diámetro aerodinámico promedio de $2,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$ y se encuentran predominantemente compuestas por Fe (III), Ni (II) y V (IV), en forma de sulfatos solubles en agua (Killingsworth y col., 1997; Ostachuk y col., 2008).

1.2. Análisis elemental de ROFA

Se analizó el tamaño y la morfología de ROFA mediante microscopía electrónica de barrido utilizando un microscopio Zeiss EVO 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). La composición elemental cualitativa y cuantitativa de ROFA se evaluó mediante microanálisis por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) (Figuras 14 y 15). El análisis de los resultados se llevo a cabo mediante el programa INCA (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido).

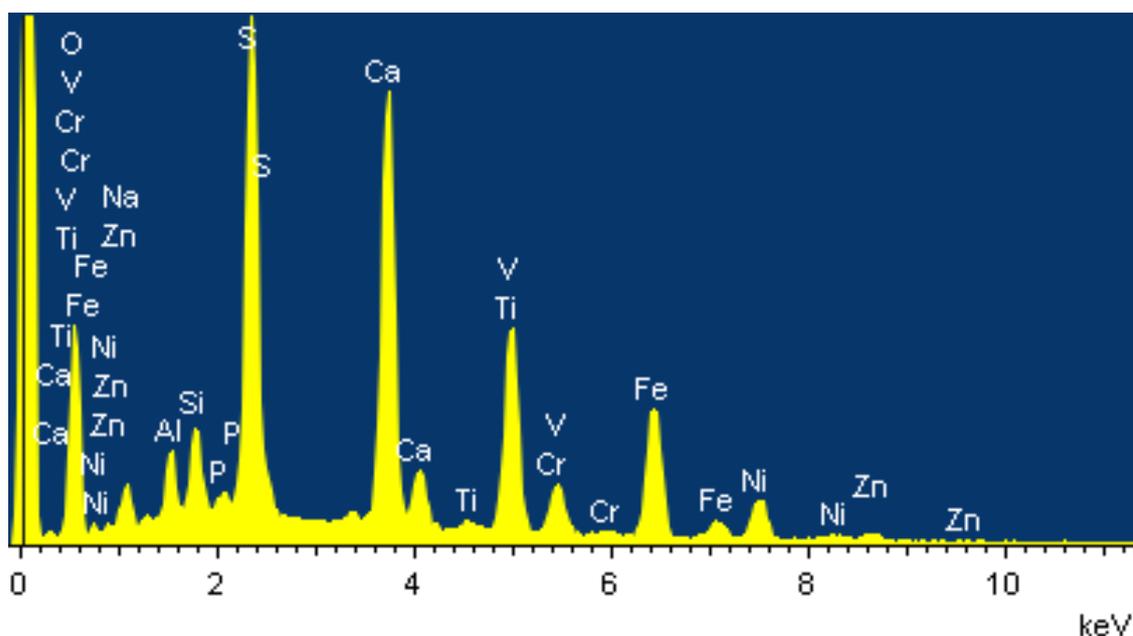


Figura 14. Patrón de EDS proveniente de una muestra de ROFA utilizada en el presente trabajo de tesis.

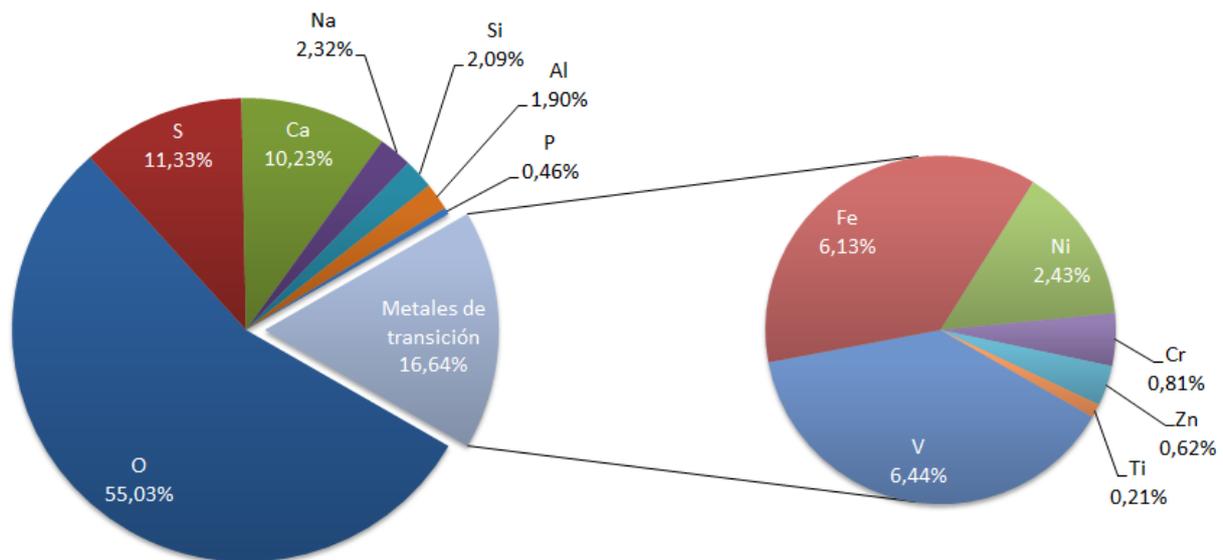


Figura 15. Composición elemental cualitativa y cuantitativa de las partículas ROFA utilizadas en el presente trabajo de tesis, determinada por EDS. Los resultados se expresan como el % P/P de cada elemento.

1.3. Preparación de la suspensión de ROFA

Las partículas ROFA fueron pesadas y resuspendidas en solución fisiológica estéril (NaCl 0,9% P/V), en una concentración final de 0,5 mg/mL. A continuación, la suspensión obtenida fue incubada a temperatura ambiente durante 10 min en un baño de agua por ultrasonidos Testlab TB-02 TA (Testlab, Buenos Aires, Argentina). Cada suspensión de ROFA fue preparada inmediatamente antes de su utilización (Goldsmith y col., 1998).

1.4. Preparación de la fracción soluble de ROFA y de las partículas ROFA lavadas

En primer lugar, se preparó una suspensión de ROFA en solución fisiológica estéril (1 mg/mL), según se detalló en el punto 1.3 de esta sección. Luego se centrifugó la suspensión a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante libre de partículas de esta primera centrifugación fue utilizado como "fracción soluble de ROFA". El sedimento fue resuspendido nuevamente en solución fisiológica estéril, incubado durante 10 min en un baño de agua por ultrasonidos y centrifugado a 10000 g durante 10 min. Este procedimiento se repitió un total de 3 veces. El sedimento obtenido luego de la tercera centrifugación fue resuspendido en solución fisiológica estéril y utilizado como "partículas ROFA lavadas". Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente (Ostachuk y col., 2008).

1.5. Exposición *in vivo* al MP

Se utilizaron ratones hembra exocriados de la cepa Swiss de 8 semanas (20-25 g), provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). Los animales se mantuvieron bajo condiciones de humedad y temperatura controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con acceso libre al agua y comida (alimento balanceado no purificado).

Los animales fueron seleccionados al azar y expuestos al MP (1 mg ROFA/kg de peso corporal) o a solución fisiológica estéril (denominados grupo control) por instilación intranasal, mediante la técnica de la gota nasal. En primer lugar, los ratones fueron levemente anestesiados mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina (10 mg/kg de peso corporal) y xilacina (0,1 mg/kg de peso corporal). Luego se inmovilizaron a una inclinación de 60° en posición supina y se les administró una única dosis de 50 µL de la suspensión de ROFA en la cavidad nasal, utilizando una pipeta automática. Los animales pertenecientes al grupo control fueron instilados con 50 µL de solución fisiológica estéril. En todos los casos, la presencia de líquido en la cavidad nasal del ratón provoca un reflejo inspiratorio que induce a la inhalación de, al menos, un 75% de la dosis total administrada (Southam y col., 2002). Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia, trascurridas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento. Luego se recolectaron muestras de pulmón, corazón y sangre para su análisis.

En los experimentos realizados para evaluar el efecto de la exposición al MP sobre la progresión del IAM, la instilación intranasal con la suspensión de ROFA o solución salina (control) se realizó diariamente durante una semana, comenzando el día previo a la inducción del IAM. Para inducir la anestesia de los animales se utilizó una atmósfera saturada de isoflurano.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directivas de la “Reglamentación para Bioterios de Laboratorios Elaboradores de Especialidades Medicinales y/o Análisis para Terceros” (Disposición ANMAT 6344/96) y la Resolución del Consejo Superior de la Universidad de Buenos Aires N° 4081/04 que aprueba el “Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio en la Universidad de Buenos Aires”. Estas reglamentaciones siguen las recomendaciones internacionales relacionadas específicamente con la seguridad del laboratorio en trabajos con animales (ILAR/NRC, 1997; CDC/NIH, 1999).

2. Obtención y procesamiento de muestras biológicas

2.1. Cubos de tejido cardíaco

Cumplido el tiempo de exposición, los animales fueron sacrificados, se tomaron muestras de corazón y se colocaron en solución reguladora Krebs [NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaHCO₃ 24,8 mM, glucosa 5,5 mM (pH 7,4)]. Luego de ser lavado y pesado, el tejido se cortó en cubos de 1 mm³ utilizando un bisturí. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 0-4 °C (Vanasco y col., 2008).

2.2. *Homogeneizados de corazón*

Las muestras de tejido cardíaco (0,10 g de peso húmedo) se colocaron en solución reguladora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 30 mM, KCl 120 mM (pH 7,4), donde fueron cortadas y lavadas. Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas en dicha solución en una relación 1:5, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjhm con vástago de teflón. La suspensión resultante se centrifugó a 600 g durante 10 min (IEC CL31R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) para descartar núcleos y restos celulares. El sedimento fue desechado y el sobrenadante fue utilizado como homogeneizado. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 0-4 °C. Las muestras así procesadas fueron conservadas a -80 °C hasta su utilización (Evelson y González-Flecha, 2000).

2.2.1. *Preparación de la muestra para la determinación del contenido de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*

Para una adecuada preservación de la muestra, 200 µL del homogeneizado fueron mezclados con butilhidroxitolueno (BHT) en una concentración final de 0,1% P/V, luego de la preparación del mismo y antes de su conservación a -80 °C. El BHT es un antioxidante ampliamente utilizado para prevenir la oxidación y peroxidación de lípidos que ocurre espontáneamente durante el manejo y conservación de las muestras biológicas, incluso a bajas temperaturas.

2.3. *Homogeneizados de pulmón*

Las muestras de tejido pulmonar (0,2 g de peso húmedo) fueron homogeneizadas en una relación 1:5 de una solución reguladora compuesta por Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1% V/V, pepstatina 1 µg/mL, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, PMSE 0,4 mM (pH 8,0), utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjhm con vástago de teflón. La suspensión resultante se centrifugó a 600 g durante 10 min para descartar núcleos y restos celulares. El sedimento fue desechado y el sobrenadante fue utilizado como homogeneizado. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 0-4 °C. Las muestras así procesadas fueron conservadas a -80 °C hasta su utilización (Evelson y González-Flecha, 2000).

2.4. *Aislamiento de mitocondrias*

La fracción mitocondrial del tejido cardíaco se obtuvo mediante centrifugación diferencial de los homogeneizados de corazón, utilizando una centrífuga Sorvall RC5C (Sorvall, Buckinghamshire, Reino Unido). En primera medida, las muestras de corazón fueron cortadas y lavadas en solución reguladora STE [sacarosa 250 mM, Tris-HCl 5 mM, EGTA 2 mM (pH 7,4)]. Luego se realizó una digestión enzimática en solución STE, suplementada con seroalbúmina bovina (BSA) libre de ácidos grasos 0,5% P/V, MgCl_2 5 mM, ATP 1 mM y 2,5 UI/mL de proteasa bacteriana tipo XXIV. Trascorridos 4 min, las muestras fueron homogeneizadas en 1:10 de solución STE utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjhm con vástago de teflón y luego centrifugadas a 8000 g por 10 min. El pellet obtenido fue resuspendido en solución STE y

centrifugado nuevamente a 700 g por 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó dos veces a 8000 g, durante 10 min cada una. Por último, el pellet obtenido fue lavado y resuspendido en 500 µL de solución STE. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 0-4 °C (Frezza y col., 2007).

2.5. Preparación de las membranas mitocondriales

Se prepararon muestras de membranas mitocondriales a partir de la suspensión mitocondrial obtenida según lo descrito en el punto anterior, seguido de tres ciclos sucesivos de congelamiento-descongelamiento. La suspensión resultante se homogeneizó mediante tres pasajes de la muestra a través de una aguja hipodérmica 29G (Boveris y col., 2002).

2.6. Muestras de sangre

Trascurrido el tiempo de exposición, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca utilizando EDTA 0,5 mM como anticoagulante.

2.6.1. Separación del plasma

La sangre obtenida según lo descrito en el punto anterior fue centrifugada a 600 g por 10 min a 4 °C. Luego de separar el paquete celular, las muestras de plasma fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

2.6.1.1. Conservación del plasma para la determinación de TBARS

Para una adecuada preservación de la muestra, 50 µL de plasma fueron mezclados con BHT a una concentración final de 0,1% P/V, luego de la separación del mismo. Las muestras así procesadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

2.6.1.2. Conservación del plasma para la determinación del contenido de GSH y GSSG

Para la evaluación de los niveles plasmáticos de GSH y GSSG por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), 100 µL de plasma fueron mezclados en una relación 1:1 con una solución de HClO₄ 1 M, EDTA 2 mM y centrifugados a 20000 g por 20 min a 4 °C. El sedimento fue descartado, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm (Corning Inc., Nueva York, NY, Estados Unidos) y almacenado a -80 °C hasta su uso.

2.6.1.3. Conservación del plasma para la determinación del contenido de ácido ascórbico

Para la determinación de los niveles plasmáticos de ácido ascórbico por HPLC, 90 µL de plasma fueron mezclados con 200 µL de ácido metafosfórico 10% P/V y centrifugados a 10000 g por 5 min a 4 °C. El sedimento fue descartado, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm y almacenado a -80 °C hasta su uso.

2.6.2. *Aislamiento de leucocitos*

Para el estudio de la activación intravascular de leucocitos y producción de NO por citometría de flujo, se aislaron leucocitos a partir de muestras de sangre periférica obtenida según se describe en el punto 2.6 de esta sección. Se realizó una primera hemólisis de 100 μ L de sangre, por incubación en una solución reguladora de lisis (Red Blood Cell Lysing Buffer®, Sigma-Aldrich) en una proporción 1:10. Transcurridos 5 min, las muestras fueron centrifugadas a 600 *g* por 6 min y el sobrenadante fue descartado. El pellet obtenido fue resuspendido nuevamente en la solución reguladora de lisis, incubado 5 min y centrifugado a 600 *g* por otros 6 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet de células obtenido fue lavado con PBS y resuspendido en solución reguladora de Hank [NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, Na_2HPO_4 0,3 mM, CaCl_2 1,3 mM, MgCl_2 0,5 mM, MgSO_4 0,6 mM, glucosa 5 mM (pH 7,4)]. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente. La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de tinción por exclusión utilizando Azul de Tripán y se descartaron las muestras cuya viabilidad fuese menor al 95% (Catz y col., 1995).

2.6.3. *Lavado bronquioalveolar (BAL)*

Trascurrido el tiempo de exposición, los animales fueron sacrificados y la tráquea fue canulada utilizando un procedimiento quirúrgico adecuado. Los pulmones fueron lavados 3 veces con 1 mL de BSA/PBS 0,1% P/V (Götz y col., 2011). El número total de células en el BAL fue cuantificado en una cámara de Neubauer. Luego las muestras fueron centrifugadas a 600 *g* por 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue almacenado a -80 °C hasta su uso. El pellet celular obtenido fue utilizado para evaluar las subpoblaciones de leucocitos y los niveles de citoquinas intracelulares por citometría de flujo.

3. ***Evaluación del metabolismo oxidativo y energético cardíaco***

3.1. *Consumo de O₂ en cortes de tejido*

La determinación de la velocidad de consumo de O₂ se llevó a cabo mediante una técnica polarográfica, utilizando un oxígrafo desarrollado para respirometría de alta resolución (Hansatech Oxygraph, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). El mismo consta de un electrodo de O₂ tipo Clark y una cámara de medida termostatazada. Se utilizaron 3 a 5 cubos de tejido cardíaco de 1 mm³, obtenidos según se describe en el punto 2.1 de esta sección. Este espesor permite que el O₂ pueda acceder libremente a todas las células de la muestra por difusión simple, evitando zonas de anoxia (Boveris y Boveris, 2007). Las muestras utilizadas provinieron de órganos frescos, transcurridos no más de 30 min luego de la eutanasia de los animales. Las medidas se realizaron en una cámara de reacción termostatazada a 30 °C con agitación continua, en un medio de reacción compuesto por 1,5 mL de solución reguladora Krebs. En estas las condiciones, la concentración de O₂ disuelto inicialmente fue de aproximadamente 220 μ M. La velocidad de consumo de O₂ se determinó por el seguimiento de la

concentración de O₂ en la cámara de reacción durante 5 min luego del agregado de los cubos. Los resultados se expresaron como ng-at O/min g tejido (Poderoso y col., 1994).

3.2. Marcadores de daño oxidativo a macromoléculas

3.2.1. Determinación del contenido de TBARS

La medida de TBARS es un método ampliamente utilizado como marcador del grado de peroxidación lipídica en muestras biológicas. Las reacciones en cadena que llevan a la oxidación de lípidos dan lugar a la formación de hidroperóxidos, los que a su vez se descomponen en productos secundarios como aldehídos y cetonas. El método utilizado detecta la formación de un aducto entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y diversos productos finales de la peroxidación lipídica, principalmente malondialdehído (MDA) (Figura 16).

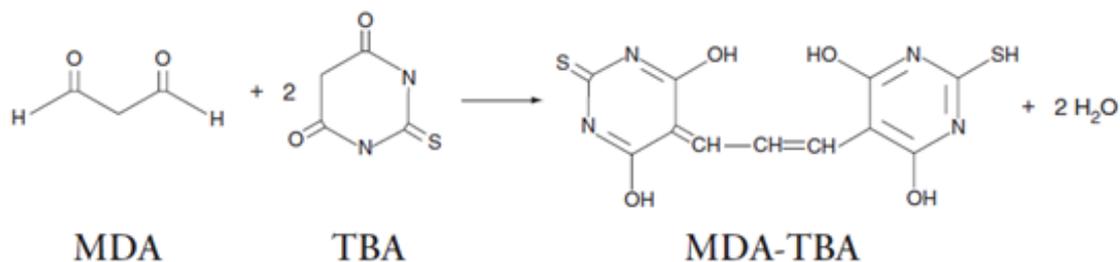


Figura 16. Formación del aducto MDA-TBA.

Los niveles de TBARS fueron evaluados en homogeneizados de corazón, obtenidos según se describe en el punto 2.2.1 de esta sección. Las muestras (100 µL) fueron incubadas con 200 µL de HCl 0,1 N, 30 µL de ácido fosfotúngstico 10% P/V y 100 µL de TBA 0,7% P/V durante 60 min a 95 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se colocó en hielo durante 5 min para detener la reacción. Los TBARS se extrajeron mediante el agregado de 1 mL de *n*-butanol y posterior centrifugación a 1000 *g* durante 5 min a temperatura ambiente, para separar las fases butanólica y acuosa formadas. Finalmente, se determinó la fluorescencia de la fase butanólica (λ_{ex} 515 nm; λ_{em} 553 nm), en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). El contenido de TBARS de las muestras se calculó a partir de una curva de calibración realizada con una solución patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, en un rango de 0 a 100 µM. Los resultados se expresaron como pmol TBARS/mg proteína (Yagi, 1976).

3.2.2. Determinación del contenido de carbonilos

La medida del contenido de carbonilos es una técnica ampliamente utilizada como marcador de daño oxidativo a proteínas. Se cuantificaron en homogeneizados de corazón, obtenidos según se describe en el punto 2.2 de esta sección. Para ello, se utilizó un ensayo colorimétrico basado en la determinación de la cantidad de 2,4-dinitrofenilhidrazona formada luego de la reacción entre la 2,4-

dinitrofenilhidrazina (DNPH) y los grupos carbonilos de proteínas que sufrieron procesos de oxidación. Los productos obtenidos, diversos derivados de la 2,4-dinitrofenilhidrazona según el aminoácido que haya sufrido la oxidación, pueden ser cuantificados espectrofotométricamente a 360 nm (Figura 17).

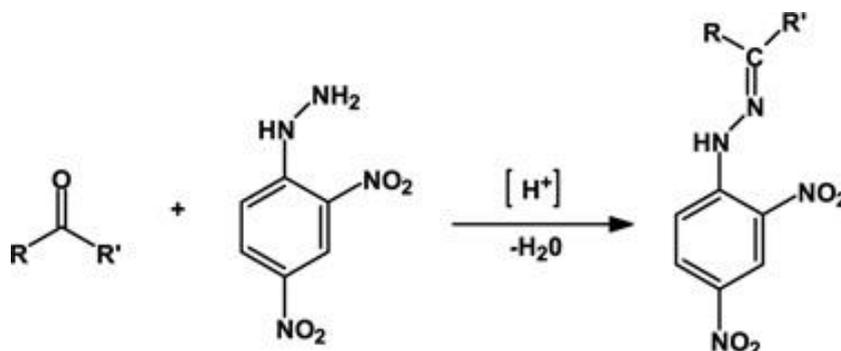


Figura 17. Reacción entre la DNPH con un grupo carbonilo de una proteína oxidada, para dar como producto coloreado a la 2,4-dinitrofenilhidrazona correspondiente.

Las muestras (200 μ L) fueron incubadas durante 1 h con 800 μ L de DNPH 2 mM a temperatura ambiente y en la oscuridad, con agitación cada 15 min. Transcurrido el tiempo de incubación, las mismas se mezclaron con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% P/V y se colocaron en hielo para inducir la precipitación de las proteínas. Luego de 10 min, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de TCA 10% P/V, se incubó nuevamente en hielo durante 10 min y se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces con 1 mL de una mezcla etanol:acetato de etilo (1:1), centrifugando a 10000 g durante 5 min a 4 °C luego de cada lavado. Finalmente, el precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de guanidina 6 M (pH 2,5) y se incubó durante 10 min a 37 °C. Se determinó la absorbancia de las muestras a 360 nm ($\epsilon = 0,022 M^{-1} cm^{-1}$) en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd., Chiyoda, Tokio, Japón). Los resultados se expresaron en nmol carbonilos/mg proteína (Levine y col., 1994).

3.3. Evaluación de la función mitocondrial

3.3.1. Respiración mitocondrial

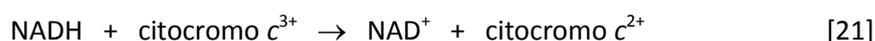
Para la determinación de la velocidad de consumo de O_2 mitocondrial se utilizó el método polarográfico descrito en el punto 3.1 de esta sección. Las medidas se realizaron incubando mitocondrias aisladas (150 μ g de proteína/mL) en la cámara de reacción termostatzada a 30 °C y conteniendo 1 mL de una solución reguladora para respiración mitocondrial [KCl 120 mM, KH_2PO_4 5 mM, EGTA 1 mM, HEPES 3 mM, BSA libre de ácidos grasos 1 mg/mL (pH 7,2)], con agitación continua. Se utilizó succinato 8 mM como sustrato para establecer el estado de respiración pasiva o Estado 4. Luego se agregó ADP 0,5 mM para alcanzar el estado de respiración activa o Estado 3. Los resultados se expresaron en ng-at O/min mg proteína. El control respiratorio (CR) mitocondrial se calculó como la

relación entre las velocidades de consumo de O_2 en Estado 3 y en Estado 4. Este parámetro depende del grado de acoplamiento mitocondrial y es un indicador sensible de la integridad y funcionalidad de esta organela (Boveris y col., 1999). Además, se realizaron mediciones en presencia de oligomicina $2 \mu M$, un inhibidor específico de la F_0-F_1 ATP sintasa, y del protonóforo carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona (m-CCCP) $2 \mu M$, que actúa causando un colapso del potencial de membrana mitocondrial a través de su capacidad para permeabilizar la membrana interna de la misma (Brand y Nicholls, 2011).

3.3.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

3.3.2.1. Actividad de NADH citocromo c reductasa (Complejo I)

La medida de la actividad del Complejo I se realizó por un ensayo colorimétrico en un espectrofotómetro Beckman DU 7400 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, Estados Unidos) con arreglos de diodos. La determinación se fundamenta en la reducción del citocromo c^{3+} a citocromo c^{2+} , siguiendo la formación de citocromo c^{2+} ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en función del tiempo, según [21]:



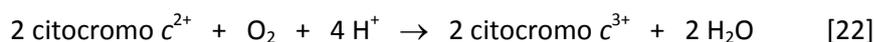
Las mediciones se realizaron a $30^\circ C$, mediante el agregado de una suspensión de membranas mitocondriales ($0,25 \text{ mg proteína/mL}$) a un medio de reacción compuesto por solución reguladora K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM ($\text{pH } 7,2$), citocromo c^{3+} $25 \mu M$ y KCN $0,5 \text{ mM}$, y suplementada con NADH $0,2 \text{ mM}$. Se siguió la reducción del citocromo c^{3+} a citocromo c^{2+} a 550 nm . El KCN se utilizó para inhibir la oxidación del citocromo c^{3+} en el Complejo IV. Los resultados obtenidos se expresaron como $\text{nmol/min mg proteína}$.

3.3.2.2. Actividad de succinato citocromo c reductasa (Complejo II)

Se utilizó un procedimiento análogo al descrito en el punto anterior, reemplazando el NADH $0,2 \text{ mM}$ por succinato $0,5 \text{ mM}$ como sustrato. Los resultados obtenidos se expresaron en $\text{nmol/min mg proteína}$.

3.3.2.3. Actividad de citocromo oxidasa (Complejo IV)

La medición de la actividad del Complejo IV se fundamenta en la oxidación del citocromo c^{2+} a citocromo c^{3+} [22].



Las mediciones se realizaron a $30^\circ C$, mediante el agregado de una suspensión de membranas mitocondriales ($0,25 \text{ mg proteína/mL}$) a un medio de reacción conteniendo solución reguladora K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM ($\text{pH } 7,2$), suplementada con citocromo c^{2+} $60 \mu M$. Se siguió la oxidación del citocromo c^{2+} ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a citocromo c^{3+} a 550 nm . Dado que la cinética de la reacción catalizada

por la citocromo oxidasa es de pseudo primer orden, la actividad se expresó en función de la constante de velocidad (k') como $k'/\text{mg proteína}$ (Yonetani, 1967).

La solución de citocromo c^{2+} debió ser preparada en el laboratorio, dado que no es posible obtenerlo comercialmente. Para ello, se disolvió el citocromo c^{3+} en solución reguladora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM (pH 7,4) y se agregó una punta de espátula de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sólido para promover su reducción. El exceso del agente reductor se eliminó mediante el pasaje de la solución a través de una columna de Sephadex G-25. Posteriormente, se realizó la titulación espectrofotométrica de la solución de citocromo c^{2+} .

3.3.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

La evaluación del $\Delta\Psi_m$ se realizó mediante citometría de flujo y el uso de la sonda potenciométrica yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC_6) (Figura 18). Este fluoróforo se acumula selectivamente en la matriz mitocondrial, emitiendo fluorescencia verde en función del gradiente de potencial electroquímico a lo largo de la membrana interna mitocondrial. Cuando se produce una despolarización de esta membrana, la sonda sale de la mitocondria y deja de emitir fluorescencia, por lo que la señal disminuye.

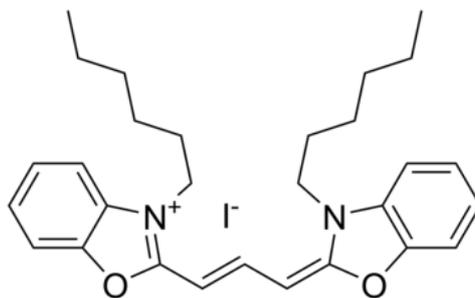


Figura 18. Estructura química del DiOC_6 , utilizado para evaluar el $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo.

Previo a la evaluación del $\Delta\Psi_m$, se seleccionó y caracterizó a la población mitocondrial a estudiar según sus características de dispersión de luz (FSC, del inglés *forward scatter*, versus SSC, del inglés *side scatter*) y fluorescencia del bromuro de naranja de 10-*N*-nonilacridina (NAO). El NAO es una sonda que se une selectivamente a la cardiolipina (Figura 19), fosfolípido que se encuentra exclusivamente y en alta proporción en la membrana interna mitocondrial (Haines y Dencher, 2002). Para ello, una suspensión de mitocondrias aisladas de corazón (25 μg proteína/mL) se incubaron con NAO 100 nM durante 20 min a 37 °C y en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se adquirieron 10000 eventos excluyendo restos celulares y mitocondrias dañadas, utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-III (Partec GmbH, Münster, Alemania) equipado con un láser de argón de 488 nm. Se evaluó la señal de NAO en el canal FL-1 (verde) en comparación con una muestra incubada en ausencia del fluoróforo.

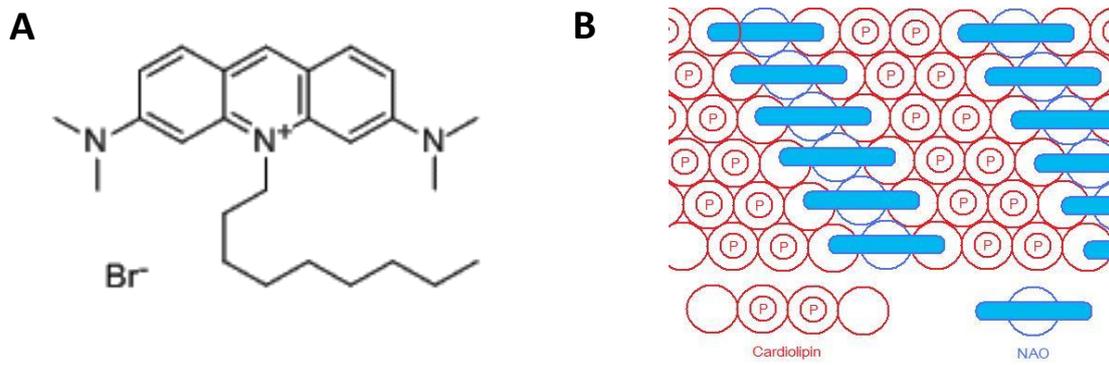


Figura 19. (A) Estructura química del NAO. (B) Esquema de la unión del NAO a la cardiolipina en la membrana interna mitocondrial (Haines y Dencher, 2002).

Luego de identificar y caracterizar a la población en estudio, se evaluaron los cambios en el $\Delta\Psi_m$ mediante el análisis de la fluorescencia emitida por la sonda DiOC₆. Las mitocondrias aisladas (25 μg proteína/mL) se incubaron en la solución reguladora utilizada para la evaluación de la respiración mitocondrial, suplementada con DiOC₆ 30 nM, durante 20 min a 37 °C y en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se adquirieron 30000 eventos y se determinó la fluorescencia de las muestras por citometría de flujo. La señal de DiOC₆ se analizó en el canal FL-1 (verde), obteniendo valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) de la población mitocondrial. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Cyflogic (CyFlo Ltd., Turku, Finlandia). Los cambios en el $\Delta\Psi_m$ se evaluaron en Estado 4, al adicionar succinato 8 mM al medio de incubación, y en Estado 3, luego del agregado de ADP 125 mM. Para evaluar la autofluorescencia de las mitocondrias, se realizaron medidas en alícuotas de muestra incubadas en las mismas condiciones pero en ausencia de la sonda. A modo de control positivo del ensayo, se adicionó m-CCCP 2 μM como desacoplante. Las muestras que no mostraron un descenso significativo del $\Delta\Psi_m$ bajo estas condiciones fueron descartadas (Czerniczyniec y col., 2011).

3.3.4. Determinación del contenido y producción mitocondrial de ATP

La producción de ATP se determinó mediante un método quimioluminiscente (Drew y Leeuwenburgh, 2003) basado en el sistema luciferina-luciferasa, donde la reacción estequiométrica entre la luciferina y el ATP produce un fotón que puede ser cuantificado en un luminómetro. La luciferasa de luciérnaga cataliza esta oxidación de D-luciferina dependiente de ATP, según la reacción mostrada en la Figura 20.

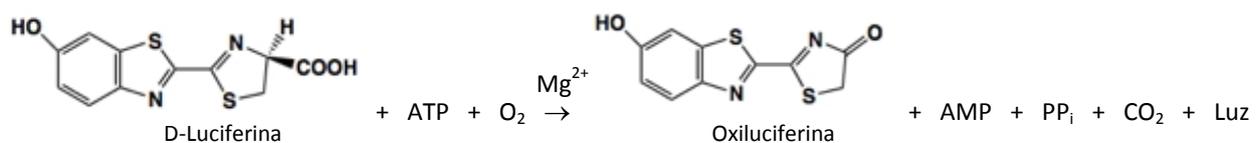


Figura 20: Emisión de quimioluminiscencia por el sistema luciferina-luciferasa.

Según la estequiometría de la reacción anterior, la quimioluminiscencia emitida será directamente proporcional a los niveles de ATP de la muestra. La enzima adenilato ciclasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato entre 2 moléculas de ADP, generando ATP y AMP [23], interfiriendo con la determinación.



Por esta razón, se incluyó di(adenosina-5'-)pentafosfato en el medio de reacción, con el objetivo de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa y aumentar la especificidad del ensayo.

Previamente a la evaluación de la producción de ATP, se determinó el control respiratorio mitocondrial según lo descrito en el punto 3.3.1 de esta sección. Luego el contenido mitocondrial de ATP se midió en un medio de reacción compuesto por KCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 2 mM, BSA 0,1% P/V, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, MgCl_2 100 μM (pH 7,4). Las mitocondrias aisladas (0,25 mg proteína/mL) se agregaron a la mezcla de reacción junto con luciferina 40 μM y luciferasa 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para evaluar la velocidad de producción de ATP, la reacción se inició con el agregado de succinato 8 mM y ADP 125 mM. Las mediciones se realizaron en un luminómetro de placa Labsystems Luminoskan EL (Labsystems, Minneapolis, MN, Estados Unidos) a 30 °C cada 15 s, durante un total de 3 min. Para asegurar que la luminiscencia registrada depende exclusivamente de la síntesis de ATP, a cada muestra se le realizó un control negativo en presencia de oligomicina 2 μM . Se realizó una curva de calibración utilizando ATP como estándar, en un rango de 0 a 100 nmol. El contenido mitocondrial de ATP fue expresado como nmol ATP/mg proteína, mientras que la velocidad de producción de ATP se expresó como nmol de ATP/min mg proteína (Vivez-Bauza y col., 2007).

3.3.5. *Relación P/O*

Una vez determinados los valores de producción de ATP y consumo de O_2 mitocondrial, se calculó la relación P/O como la relación entre la velocidad de producción de ATP y el consumo de O_2 en Estado 3 o de respiración activa para cada una de las muestras (Brand y Nicholls, 2011).

4. ***Evaluación de la función cardíaca***

4.1. *Perfusión del órgano aislado*

Transcurrido el tiempo de exposición, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección i.p. de pentobarbital sódico (150 mg/kg de peso corporal) y heparina sódica (500 UI/kg de peso corporal). El corazón fue exteriorizado y la arteria aorta fue canulada utilizando una cánula 21G. Se inició la perfusión retrógrada del órgano de acuerdo con la técnica de Langendorff, utilizando solución reguladora Krebs equilibrada con 95% de O_2 y 5% de CO_2 a 37 °C. Un pequeño balón de látex fue conectado a través de un catéter de plástico a un transductor de presión Deltran II (Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, Estados Unidos) y se insertó en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. El catéter con el transductor fue colocado de manera tal de asegurar la posición del balón en el ventrículo izquierdo. Dos electrodos

fueron suturados al corazón y conectados a un marcapasos, a fin de inducir una frecuencia cardíaca constante de 470 ± 30 latidos/min. La presión de perfusión coronaria (PPC) se registró a través de un transductor de presión conectado a la línea de perfusión. El corazón fue perfundido a flujo constante, manteniendo una PPC de 73 ± 3 mmHg durante todo el experimento. La presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) fue calculada como la diferencia entre la presión sistólica máxima y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo. La relajación miocárdica (diástole) se analizó como el tiempo necesario para que la PDVI caiga hasta un 50% del pico máximo de la PDVI (t_{50}) (Sutherland y col., 2003).

4.2. Reserva cardíaca

Las reservas contráctil y diastólica cardíaca fueron evaluadas a través de las medidas de la PDVI y el t_{50} , respectivamente, antes y después de un estímulo β -adrenérgico inducido por el agregado de isoproterenol (ISO) $1 \mu\text{M}$ a la línea de perfusión (Sicari y col., 2008).

4.3. Correlación entre el consumo de O_2 cardíaco y la PDVI

Para determinar la existencia de correlación entre el metabolismo oxidativo y la función contráctil cardíaca, se determinó el consumo de O_2 en los mismos corazones utilizados para la evaluación de la PDVI, tanto en condiciones basales como luego de la adición de ISO. Finalizado el experimento, los corazones fueron removidos del aparato de perfusión de Langendorff y se determinó el consumo de O_2 en cortes de tejido según lo descrito en el punto 3.1 de esta sección.

5. Marcadores sistémicos de estrés oxidativo

5.1. Marcadores de daño oxidativo a macromoléculas

5.1.1. Contenido plasmático de TBARS

Se utilizó un procedimiento análogo al descrito en el punto 3.2.1 de esta sección, empleando como muestra $100 \mu\text{L}$ de una dilución 1/4 de plasma en solución fisiológica. En este caso, los resultados se expresaron como μM TBARS (Yagi, 1976).

5.1.2. Contenido plasmático de carbonilos

Se utilizó un procedimiento análogo al descrito en el punto 3.2.2 de esta sección, empleando como muestra $200 \mu\text{L}$ de una dilución 1/10 de plasma en solución fisiológica. Los resultados se expresaron como nmol carbonilos/mg proteína (Levine y col., 1994).

5.2. Defensas antioxidantes

5.2.1. Actividad plasmática de SOD

El método utilizado para la determinación de la actividad de SOD se basa en la inhibición de la autooxidación de la epinefrina en medio alcalino. Esta oxidación ocurre mediante una compleja serie de

reacciones en cadena, en la cual uno de los intermediarios es el $O_2^{\bullet-}$. El producto final de la reacción es el epinocromo, un compuesto coloreado que puede detectarse espectrofotométricamente (Figura 21).

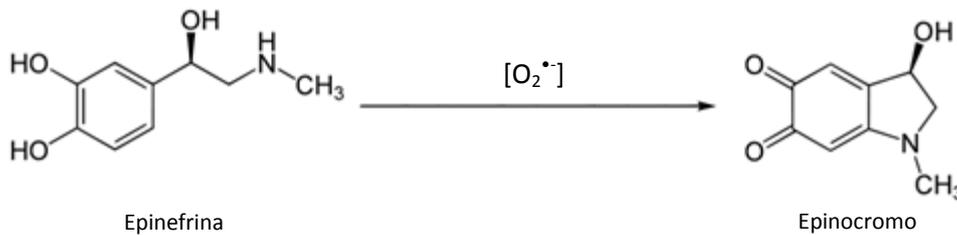


Figura 21. Reacción de autooxidación de la epinefrina en medio alcalino.

El ensayo utilizado se fundamenta en que la SOD presente en la muestra compite por el $O_2^{\bullet-}$ producido por el sistema de detección. Al no poder cuantificarse la concentración de enzima, o su actividad, en términos de cantidad de sustrato por unidad de tiempo, se utilizan unidades relativas para expresar su actividad. Una unidad de SOD (U SOD) se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la velocidad de oxidación de la epinefrina en las condiciones de reacción descritas (Misra y Fridovich, 1972).

La actividad de la enzima fue determinada en cantidades variables (10-50 μ L) de muestras de plasma, siguiendo la inhibición de la velocidad de formación del epinocromo a 480 nm ($\epsilon = 2,96 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd.). El medio de reacción consistió de una solución reguladora compuesta por glicina 50 mM y epinefrina 1 mM (pH 10,5). Los resultados se expresaron en U SOD/L plasma.

5.2.2. Niveles plasmáticos de GSH y GSSG

Las muestras de plasma fueron procesadas según lo descrito en el punto 2.6.1.2 de esta sección. El análisis de las mismas se realizó en un equipo de HPLC Perkin Elmer LC 250 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), equipado con un procesador de muestras LC ISS 200 y un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Bedford, MA, Estados Unidos). Se utilizó una válvula de inyección BAS Uniject Microbore 4497 (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, Estados Unidos), conectada a una columna Supelcosil LC-18 (250 \times 4,6 mm ID, de 5 μ m de diámetro de partícula) protegida por una precolumna Supelguard (20 \times 4,6 mm ID) (Supelco, Bellefonte, PA, Estados Unidos) y a una bomba para HPLC Waters 510 (Waters Co., Milford, MA, Estados Unidos). Como sistema de detección se utilizó un detector electroquímico LC-4C (Bioanalytical Systems Inc.) conectado a una computadora Macintosh SE/30 (Apple Computers Inc., Cupertino, CA, Estados Unidos), donde se registró el cromatograma de la corrida, se identificaron los picos y se calcularon las áreas correspondientes. Para la integración de las mismas se utilizó el programa Dynamax HPLC Method Manager (Rainin Instrument Co., Woburn, MA, Estados Unidos). La fase móvil utilizada fue Na_3PO_4 20 mM (pH 2,7) a una velocidad de flujo de 1,2 mL/min. En estas condiciones, los tiempos de retención para GSH y GSSG fueron de 5,3 min y 15,9 min, respectivamente. El detector

electroquímico fue fijado a un potencial de oxidación de +0,800 V. Se utilizaron soluciones de GSH y GSSG en un rango de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como estándares externos e internos, para identificar los picos correspondientes y cuantificar a partir de la interpolación del área de cada uno de los mismos en curvas de calibración (Rodríguez-Ariza y col., 1994).

5.2.3. Niveles plasmáticos de ácido ascórbico

Las muestras de plasma fueron procesadas según lo descrito en el punto 2.6.1.3 de esta sección. Se utilizó el mismo equipo de HPLC descrito en el apartado anterior, a excepción de la columna que fue reemplazada por una Supelcosil LC-18 ($33 \times 4,6$ mm ID, de 3 μm de diámetro de partícula) (Supelco). La fase móvil utilizada fue ácido metafosfórico 0,8% P/V a una velocidad de flujo fue de 1 mL/min. En estas condiciones, el tiempo de retención para el ácido ascórbico fue de 0,8 min. El detector electroquímico fue fijado a un potencial de oxidación de +0,600 V. Se utilizaron soluciones de ácido ascórbico en un rango de 0 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como estándar externo e interno, para identificar el pico correspondiente y cuantificar a partir de la interpolación de su área en la curva de calibración (Kutnink y col., 1987).

6. Marcadores de daño tisular

6.1. Actividad de creatina quinasa (CK) y de lactato deshidrogenasa (LDH)

Las actividades plasmáticas de estas dos enzimas fueron utilizadas como marcadores de daño tisular. Para ello, se utilizaron kits comerciales (Wiener, Rosario, Argentina) basados en ensayos espectrofotométricos y siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Los resultados se expresaron como U/L plasma.

7. Evaluación de la respuesta inflamatoria

7.1. Perfil de citoquinas

Los niveles de TNF- α , IL-6, IL-10 e interferón (INF)- γ en plasma y homogeneizados de pulmón fueron determinados mediante técnicas de ELISA. Se utilizaron kits comerciales (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como pg/mL de plasma, o como pg/mg de proteína para homogeneizados de pulmón. Alternativamente, se evaluaron los niveles de TNF- α e IL-6 en muestras de BAL, plasma y sobrenadantes de medios de cultivo, utilizando una técnica basada en la detección simultánea de citoquinas por citometría de flujo. Se utilizó el kit comercial BD Cytokine Bead Array® (CBA) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como pg/mL en todos los casos.

7.2. Activación intravascular de leucocitos

Para evaluar el nivel de activación de distintas subpoblaciones de leucocitos, se utilizó la técnica de citometría de flujo en presencia de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). La DCF en su forma diacetato

difunde pasivamente dentro de las células, donde es desesterificada por las esterasas intracelulares. Luego la DCF es rápidamente oxidada para dar un producto fluorescente verde (λ_{ex} 504 nm; λ_{em} 524 nm) por reacción con diversas especies oxidantes, como el H_2O_2 y diversos ROOH (Figura 22). De esta manera, la señal resultante puede ser utilizada como indicador del estado redox intracelular.

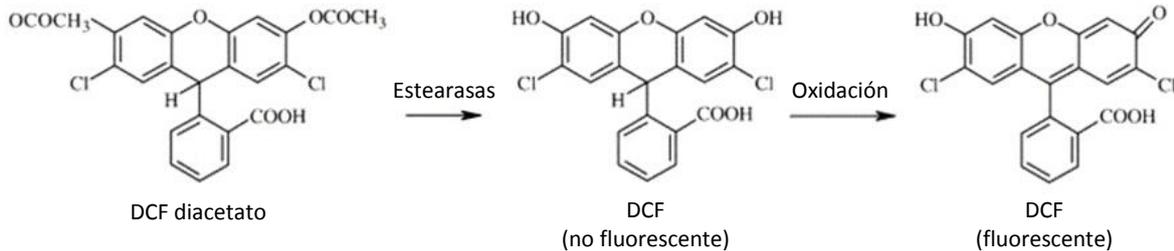


Figura 22. Desesterificación y oxidación de la DCF diacetato. Luego de ser desesterificada por las esterasas intracelulares, la DCF es oxidada dentro de la célula dando un producto fluorescente verde que puede ser detectado por citometría de flujo.

Los leucocitos aislados de sangre periférica (1×10^6 células/mL) fueron incubados con DCF diacetato 5 μM en la oscuridad a 37 °C. Luego de 30 min, se adquirieron 10000 eventos por muestra en un citómetro de flujo Partec PAS-III. Las diferentes poblaciones de leucocitos se seleccionaron según sus características de dispersión de luz (FSC versus SSC) y la señal de DCF fue cuantificada en el canal FL-1 (verde). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Cyflogic y la cuantificación se realizó teniendo en cuenta la IFM de la DCF para cada una de las poblaciones seleccionadas (Walrand y col., 2003).

7.3. Producción de NO en leucocitos

La producción de NO en leucocitos se determinó mediante un procedimiento análogo al descrito en el punto anterior, pero utilizando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) diacetato 10 μM como sonda. Así como era el caso para la DCF diacetato, este fluoróforo ingresa a la célula por difusión pasiva, es desesterificado por las esterasas intracelulares y reacciona con el NO generando el producto fluorescente verde triazolofluoresceína (DAF-2T) (λ_{ex} 500 nm; λ_{em} 515 nm) (Figura 23).

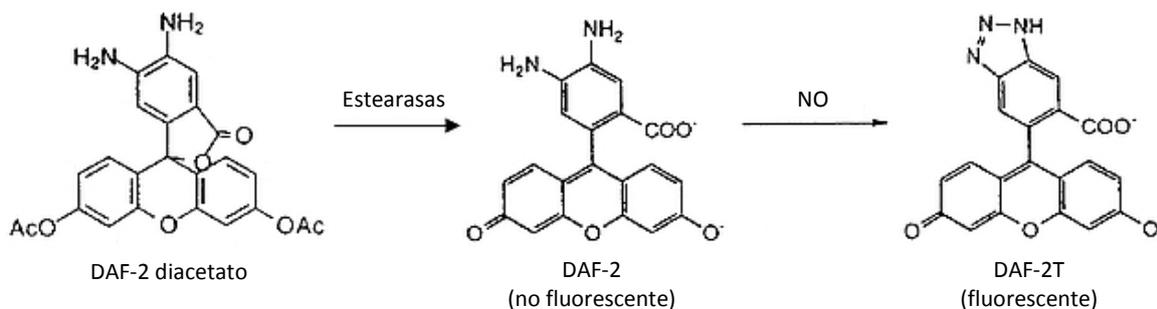


Figura 23. Desesterificación y oxidación de la DAF-2 diacetato. Luego de ser desesterificada por las esterasas intracelulares, la DAF-2 reacciona con el NO dentro de la célula dando el producto fluorescente verde DAF-2T que puede ser detectado por citometría de flujo.

Las diferentes poblaciones de leucocitos se seleccionaron según sus características de dispersión de luz (FSC versus SSC) y la señal de DAF-2 fue cuantificada en el canal FL-1 (verde). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Cyflogic y la cuantificación se realizó teniendo en cuenta la IFM de la DAF-2 para cada una de las poblaciones seleccionadas (Tiscornia y col, 2009).

7.4. *Análisis de las muestras de BAL*

El número total de células en el BAL y el perfil de citoquinas en el sobrenadante del mismo fueron determinados como se detalló en los puntos 2.6.3 y 7.1 de esta sección, respectivamente. En cuanto al recuento diferencial y los niveles intracelulares de citoquinas, el pellet celular del BAL fue analizado por citometría de flujo, utilizando un equipo FACS Canto II (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Las células fueron lavadas y resuspendidas en *buffer* fosfato salino (PBS) suplementado con BSA 0,1% P/V. Se bloquearon los receptores del fragmento Fc de inmunoglobulinas mediante incubación con 0,5 µg de un anticuerpo anti-CD16/CD32 durante 10 min en hielo. Luego las células fueron marcadas con anticuerpos conjugados dirigidos a antígenos de superficie, incubando la mezcla durante 25 min en hielo y al abrigo de la luz. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS/BSA 0,1% P/V y resuspendidas en 200 µL de solución fijadora CellFIX®. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, Estados Unidos). Las distintas subpoblaciones de leucocitos de interés se clasificaron de la siguiente manera: macrófagos (CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺), neutrófilos (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁻, Gr-1⁺) y linfocitos (CD45⁺, CD3⁺). Los resultados se expresaron como el porcentaje de cada subpoblación con respecto al total de leucocitos. Para la tinción intracelular de citoquinas, las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit comercial Cytofix/Cytoperm® (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante, seguido de una incubación con anticuerpos conjugados anti-TNF-α y anti-IL-6 (Wolf y col., 2011).

7.5. *Extravasación de leucocitos*

7.5.1. *Microscopía intravital*

Ratones macho endocriados de la cepa C57BL/6J de 8 semanas (20-25 g) (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME, Estados Unidos) fueron seleccionados al azar y expuestos a ROFA o a solución salina como se describió en el punto 1.5 de esta sección. Luego de 3 h, los animales fueron anestesiados mediante una inyección i.p. de ketamina (185 mg/kg de peso corporal) y xilacina (60 mg/kg de peso corporal) y colocados sobre una placa calefactora para mantener al temperatura corporal. Se realizó una incisión longitudinal en el abdomen del ratón y se montó cuidadosamente una porción del íleon bajo un microscopio intravital AxioScope Vario, equipado con un objetivo de inmersión W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC M27 75 mm y una cámara de alta sensibilidad AxioCam MRm (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para visualizar los leucocitos, se realizó una marcación fluorescente mediante una inyección retroorbital de 60 µL de rodamina 3G (1 mg/mL). Se seleccionaron venas del lecho mesentérico de aproximadamente 100 µm de

diámetro y se tomaron videos de 30 s cada uno utilizando el programa AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). El rodamiento de leucocitos se definió como el número total de leucocitos que se desplazaron a una velocidad menor que los eritrocitos. La velocidad de rodamiento se calculó como el tiempo promedio que necesitó cada célula para desplazarse sobre el endotelio a lo largo de una distancia de 100 μm . La adhesión de leucocitos se definió como el número de células que permanecieron inmóviles durante 30 s. Como control positivo del ensayo, ratones no instilados recibieron una inyección i.p. de 200 ng de TNF- α y se analizaron luego de 4 h. Tanto el rodamiento como la adhesión de leucocitos fueron cuantificados siguiendo protocolos a doble ciego (Lauterbach y col., 2008).

7.5.2. Peritonitis estéril

Transcurrida 1 h luego de la exposición al MP, ratones macho C57BL/6J recibieron una inyección i.p. de 2 mL de caldo tioglicolato 4% P/V. Luego de 4 h, los animales fueron sacrificados con CO₂ y se realizó un lavado peritoneal con 5 mL de medio RPMI (Figura 24). El número total de células del exudado peritoneal (CEP) se cuantificó en una cámara de Neubauer (Wolf y col., 2011).

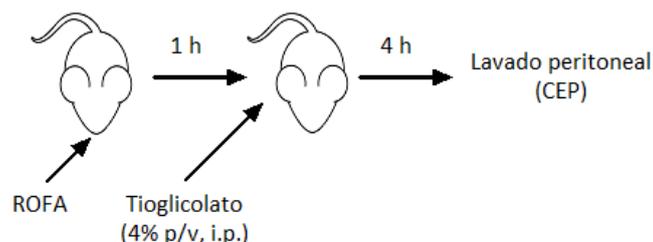


Figura 24. Esquema de la inducción de la peritonitis estéril con caldo tioglicolato, para evaluar el rol de la exposición a ROFA en la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal.

7.6. Marcador de activación de células mieloides

Se evaluó la abundancia del epítipo de activación CBRM1/5 de la integrina leucocitaria CD11b (antígeno de macrófago 1 o Mac-1) mediante citometría de flujo (Diamond y Springer, 1993), utilizando un equipo FACS Canto II. Se obtuvieron muestras de sangre tal como se describió en el punto 2.6 de esta sección y se separó el plasma del paquete celular como se enunció en el punto 2.6.1. Se lisaron los glóbulos rojos mediante la incubación del pellet celular en 10 mL de una solución reguladora de lisis [NH_4Cl 155 mM, K_2HPO_4 5,7 mM, EDTA 0,1 mM (pH 7,3)] durante 15 min a temperatura ambiente. Luego los leucocitos fueron lavados y resuspendidos en PBS/BSA 0,1% P/V, se bloquearon los receptores Fc y se marcaron con anticuerpos conjugados dirigidos a antígenos de superficie y al epítipo de activación CBRM1/5. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en solución fijadora CellFIX®. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa FlowJo. Las distintas subpoblaciones de leucocitos de interés se clasificaron de la siguiente manera: neutrófilos (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁻, Gr-1⁺), monocitos (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺), monocitos no inflamatorios (CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Gr-1⁻) y monocitos inflamatorios (CD45⁺,

CD11b⁺, CD115⁺, Gr-1⁺). Los resultados se expresaron como la IFM de la señal correspondiente a CD11b-CBRM1/5-FITC, para cada una de la subpoblaciones de leucocitos de interés (Wolf y col., 2014).

7.7. Marcadores de activación del endotelio

Se evaluaron los niveles plasmáticos de la fracción soluble de las moléculas de adhesión intercelular 1 (sICAM-1 o CD54) y vascular 1 (sVCAM-1 o CD106), mediante la técnica de ELISA. Se utilizaron kits comerciales (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como ng/mL de plasma.

7.8. Modelo de ratones deficientes en monocitos en circulación periférica

Como modelo animal de ratones carentes de monocitos en circulación sistémica, se utilizaron ratones C57BL/6J tratados con liposomas cargados con diclorometil bifosfonato (clodronato), previo a la exposición a ROFA. El clodronato es un bifosfonato altamente hidrofílico, que es incapaz de atravesar las membranas lipídicas en su forma libre. Sin embargo, al ser administrado en forma de liposomas, los monocitos y macrófagos lo pueden internalizar por endocitosis. Una vez dentro de la célula, el clodronato induce apoptosis en un lapso de 24 h por bloqueo del metabolismo energético mitocondrial (van Rooijen y Hendrikx, 2010).

Según la vía de administración de los liposomas, la depleción de monocitos puede ser restringida a determinados órganos y tejidos, como se muestra en la Figura 25 para el caso de una inyección intravenosa (i.v.) (flecha verde).

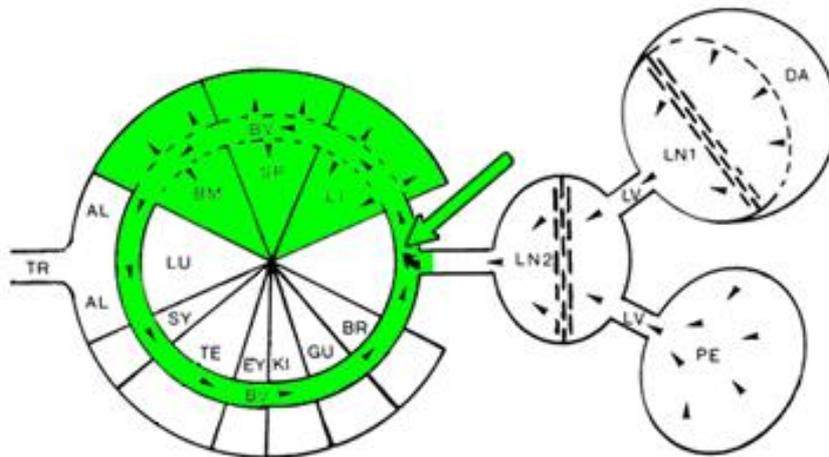


Figura 25. Esquema de la depleción de monocitos inducida por una inyección i.v. de clodronato en forma de liposomas. En verde se indican los órganos y tejidos de donde los monocitos son eliminados. TR: tráquea, AL: alvéolo, LU: pulmón, BM: médula ósea, SP: bazo, Li: hígado, BR: cerebro, GU: intestino, KI: riñón, EY: ojo, TE: testículo, SY: espacio sinovial, BV: vasos sanguíneos, DA: piel, LN1 y LN2: nodulos linfáticos, LV: vasos linfáticos, PE: cavidad peritoneal (adaptado de www.clodronateliposomes.org).

Con el objetivo de eliminar preferentemente a los monocitos de circulación periférica, ratones C57BL/6J recibieron una inyección i.v. de 200 μ L de liposomas cargados con clodronato. Como control, se

utilizaron los mismos liposomas cargados con PBS. La depleción de monocitos en circulación periférica fue corroborada mediante citometría de flujo, utilizando un procedimiento análogo a lo descrito en el punto 7.6 de esta sección. El resultado de la caracterización del modelo se muestra en la Figura 26.

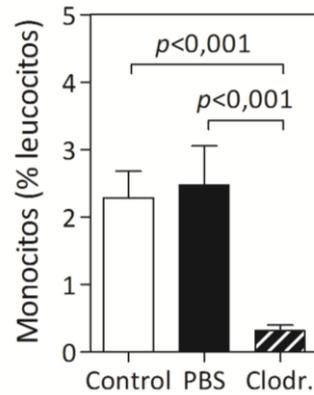


Figura 26. Monocitos en circulación periférica de ratones C57BL/6J control y tratados con clodronato (Clodr.) por vía i.v. Como control, se utilizaron liposomas cargados con PBS. La determinación se realizó por citometría de flujo, trascurridas 24 h luego de la inyección de los liposomas.

Trascurridas 24 h luego de la administración de los liposomas cargados con clodronato o PBS, los ratones fueron expuestos al MP como se describió en el punto 1.5 de esta sección. Luego de 3 h, se tomaron muestras de BAL y sangre, se separó el plasma y se realizaron perfiles de citoquinas mediante el ensayo CBA como se detalló en el punto 7.1 de esta sección. En la Figura 27 se muestra un esquema del protocolo de exposición a ROFA en este modelo de ratones carentes de monocitos en circulación periférica.

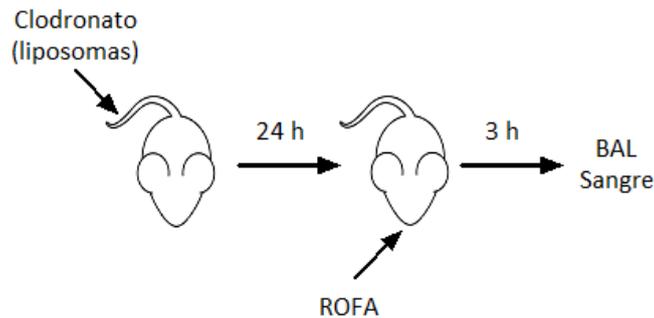


Figura 27. Esquema de la depleción de monocitos inducida por una inyección i.v. de clodronato en forma de liposomas y posterior exposición a ROFA por instilación intranasal.

7.9. Ensayos *in vitro*

7.9.1. Aislamiento y purificación de células mieloides

Se utilizaron kits comerciales basados en la separación de leucocitos mediante partículas magnéticas (EasySep®, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Los neutrófilos y los macrófagos se aislaron por selección negativa a partir de muestras de lavado peritoneal obtenidas como se indicó en el punto 7.5.2 de esta sección. Para el caso de los monocitos, se sacrificó un ratón, se colocó una muestra de bazo entre dos portaobjetos y se rompió la

cápsula rotándolos suavemente. Luego de un lavado con PBS/BSA 0,1% P/V, se filtró la suspensión de esplenocitos obtenida a través de una membrana de nylon de 100 μm y se utilizó como muestra a partir de la cual se aislaron los monocitos. La pureza de cada subpoblación de leucocitos empleada se analizó por citometría de flujo y fue mayor al 97% en todos los casos. En la Figura 28 se muestra un ejemplo de ello, para el aislamiento de neutrófilos a partir de una muestra de lavado peritoneal.

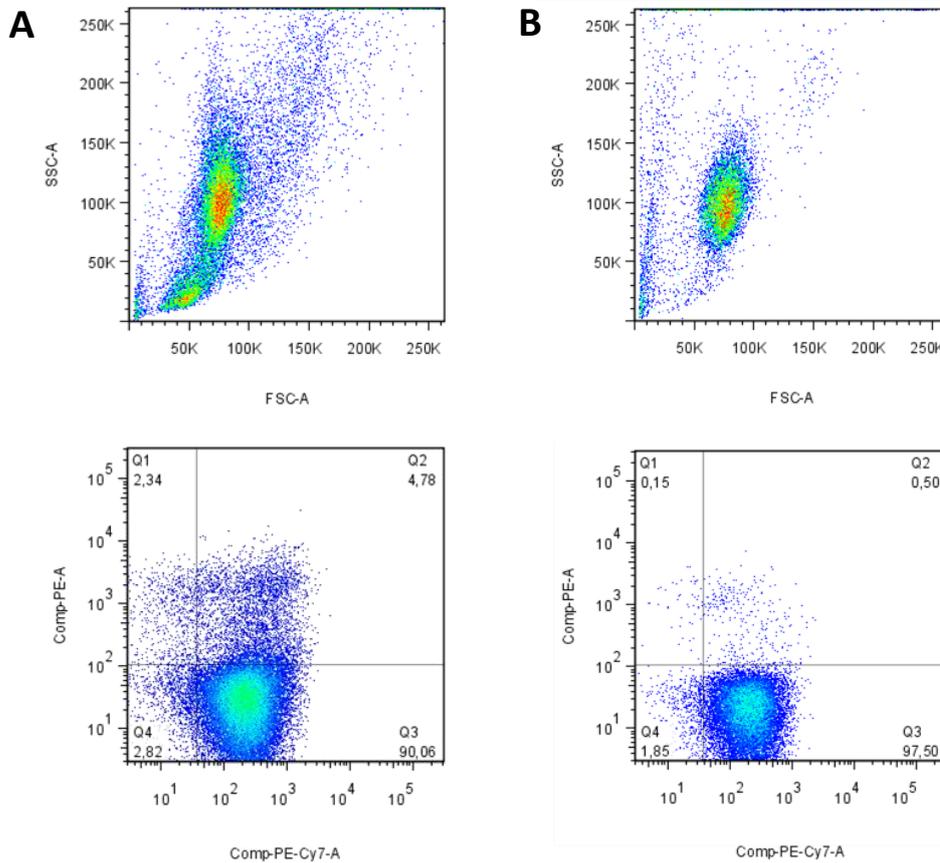


Figura 28. Evaluación del proceso de aislamiento de células mieloides. (A) Características de la muestra original. (B) Características de la muestra luego del proceso de purificación, utilizando el protocolo provisto por el fabricante. La población de interés (neutrófilos) se caracterizó como los eventos positivos para Gr-1-PE-Cy7 y negativos para CD115-PE (cuadrante Q3).

7.9.1.1. Ensayos de activación en macrófagos

7.9.1.1.1. Nivel de expresión y activación de CD11b

Los macrófagos aislados se sembraron en placas para cultivo de 96 pocillos, en una concentración de 1×10^5 células/mL de RPMI. Se evaluó el efecto directo del MP, mediante la incubación con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA en un rango de 0 a 1 $\mu\text{g/mL}$ RPMI durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, en una atmósfera controlada con 5% de CO_2 . Finalizado el experimento, las células fueron separadas de la placa mediante una incubación con 100 μL de Acutasa[®] durante 2 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Luego de un lavado con PBS/BSA 0,1% P/V, el nivel de expresión y activación de CD11b fue evaluado mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos fueron expresados como la IFM de la señal correspondiente a CD11b-APC-Cy7 o a CD11b-CBRM1/5-FITC (Diamond y Springer, 1993).

7.9.1.1.2. Liberación de citoquinas proinflamatorias

Transcurrido el tiempo de incubación, la concentración de citoquinas en el medio de cultivo fue evaluada mediante el ensayo CBA, siguiendo las instrucciones del fabricante como se indicó en el punto 7.1 de esta sección.

7.9.1.2. Ensayos de activación en neutrófilos y monocitos

Se evaluó el efecto directo de las partículas ROFA, de la fracción soluble de ROFA y de partículas ROFA lavadas sobre la activación de neutrófilos y monocitos aislados, utilizando un procedimiento análogo al detallado en el punto 7.9.1.1.1 de esta sección.

Además, en otro grupo de experimentos, el medio de cultivo de los neutrófilos y monocitos aislados fue suplementado con plasma proveniente de ratones instilados con ROFA obtenido 3 h luego del tratamiento. Se utilizó un rango de concentraciones de plasma en el medio de cultivo de 0 a 1% V/V. Como control del ensayo, las células fueron incubadas con plasma (1% V/V) obtenido de ratones instilados con solución salina (control). Para evaluar específicamente el rol de las citoquinas proinflamatorias en este contexto, se repitió el ensayo suplementando al medio de cultivo con muestras de plasma (1 % V/V) proveniente de ratones instilados con ROFA, que han sido incubadas previamente con anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α o anti-IL-6 durante 10 min en hielo. Luego de un lavado con PBS/BSA 0,1% P/V, el nivel de expresión y activación de CD11b en neutrófilos y monocitos fue evaluado mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron expresados como la IFM de la señal correspondiente a CD11b-APC-Cy7 o a CD11b-CBRM1/5-FITC en cada subpoblación de leucocitos, o como el porcentaje de cambio de la misma con respecto a la situación control, según se indica.

7.9.2. Aislamiento y cultivo de células endoteliales

Ratones macho C57BL/6J fueron sacrificados y se les extrajeron los pulmones, corazón, cerebro, bazo e hígado bajo una atmósfera estéril. Los órganos fueron lavados con PBS/BSA 0,1% P/V, cortados sobre una placa de Petri utilizando un bisturí, e incubados durante 1 h a 37 °C con colagenasa 0,1% P/V. La suspensión de células obtenida fue lavada con PBS/BSA 0,1% P/V y filtrada a través de una membrana de nylon de 70 μ m. Luego se incubaron las células con un anticuerpo de rata anti-CD31 (PECAM-1) de ratón, conjugado con partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos de oveja anti-IgG de rata (DynaL Biotech, Oslo, Noruega). Luego de 10 min a temperatura ambiente, las células fueron separadas utilizando un concentrador magnético (DynaL Biotech, Oslo, Noruega), lavadas con PBS/BSA 0,1% P/V y sembradas en botellas de cultivo T25 recubiertas de gelatina. Cuando las células llegaron a confluencia, se realizó una segunda separación, análoga a la primera, utilizando un anticuerpo de rata anti-CD102 (ICAM-2) de ratón.

Las células endoteliales obtenidas en este paso se sembraron en botellas de cultivo T75 recubiertas de gelatina. El medio de cultivo utilizado fue DMEM de alto contenido en glucosa, suplementado con suero fetal bovino 20% V/V, piruvato de sodio 1% P/V, heparina 1% P/V, factor de crecimiento endotelial bovino 1% P/V, aminoácidos no esenciales 0,6% P/V y penicilina/estreptomicina 1% P/V (Wolf y col., 2011).

7.9.2.1. Ensayos de activación en células endoteliales

Al llegar a confluencia, las células endoteliales en cultivo fueron separadas de la botella T75 obtenida en la sección anterior mediante incubación con tripsina-EDTA, lavadas con PBS/BSA 0,1% P/V y sembradas en placas de 48 pocillos en una concentración de 1×10^5 células/mL de DMEM. Las células se sincronizaron por incubación en DMEM con 5% de FCS durante 20 h, seguido de 2 h en DMEM sin suero. Luego el medio de cultivo se suplementó con partículas ROFA, la fracción soluble de ROFA, partículas ROFA lavadas, plasma o plasma incubado previamente con anticuerpos bloqueantes, de manera análoga a lo detallado en el punto 7.9.1.2 de esta sección. Finalizado los experimentos, las células fueron separadas de la placa mediante una incubación con 300 μ L de Acutasa® durante 2 min a 37 °C. Luego de un lavado con PBS/BSA 0,1% P/V, el nivel de expresión de integrinas (ICAM-1 y VCAM-1) y selectinas (P-Selectina y E-Selectina) endoteliales fue evaluado mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron expresados como la IFM de la señal correspondiente a ICAM-1-PE, V-CAM-1-FITC, P-Selectina-APC o E-Selectina-APC-Cy7, o como el porcentaje de cambio de la misma con respecto a la situación control, según se indica.

7.10. Bloqueo *in vivo* de la reacción inflamatoria dependiente de TNF- α

Para evaluar la contribución de la reacción inflamatoria sistémica sobre los efectos cardiovasculares producidos por la exposición a ROFA, se utilizó un anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF- α (Infliximab) (Figura 29). La forma de administración fue una única dosis de 25 mg/kg de peso corporal mediante una inyección i.p., 30 min antes de la instilación intranasal de ROFA (Tracey y col., 2008). Trascorridas 3 h luego de la exposición, se evaluaron los niveles plasmáticos de citoquinas, el consumo de O₂ en cortes de tejido y la función cardíaca en ratones Swiss hembra, como se describió en los puntos 7.1, 3.1 y 4 de esta sección, respectivamente.

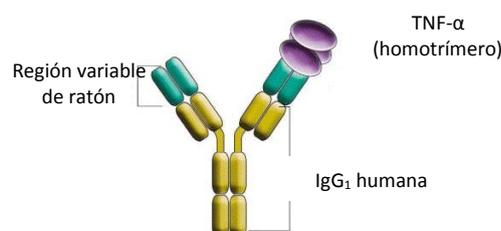


Figura 29. Esquema del anticuerpo quimérico anti-TNF- α Infliximab.

8. Modelo animal de IAM

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J anestesiados con isoflurano (2% por cada 2 litros de O₂), inmovilizados sobre una placa calefactora, intubados y ventilados mecánicamente. Luego de haber afeitado la pared del tórax, se realizó una toracotomía lateral izquierda en el cuarto espacio intercostal. Se localizó el ventrículo izquierdo y se ligó de forma permanente la arteria coronaria anterior descendente izquierda, utilizando hilo de sutura 8-0. La isquemia del miocardio se corroboró por la observación de palidez en el lecho de perfusión. Luego de remover todo el aire de la cavidad torácica mediante un catéter pleural, se suturó la incisión realizada con hilo de nylon 7-0. El procedimiento fue realizado por el mismo cirujano en todos los animales, siguiendo protocolos a doble ciego (Hilgendorf y col., 2014).

8.1. Determinación del área de infarto

En el día 4 y 7 luego de la inducción del IAM, un grupo de animales fue sacrificado con CO₂, se les extrajo el corazón y se lo cortó en secciones de 2 mm de espesor desde la punta hasta la base. Las mismas fueron incubadas en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) 1% P/V durante 10 minutos a 37 °C (pH 7,8). De esta manera, el tejido metabólicamente activo se tiñe de color rojo por la formación de 1,3,5-trifenilformazan (TTF) por acción de las deshidrogenasas celulares, mientras que la zona no teñida corresponde al área infartada (Figura 30). El tamaño de infarto fue expresado como el porcentaje del área total del ventrículo izquierdo (Donato y col., 2007).

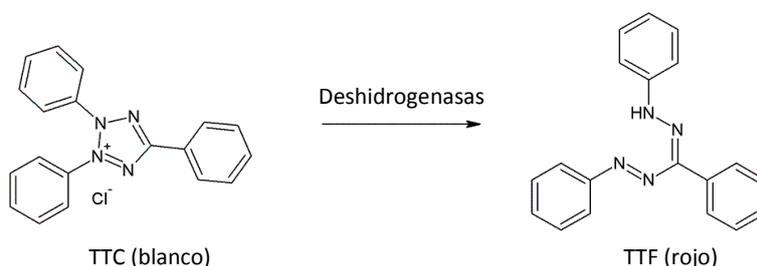


Figura 30. Formación de TTF a partir del TTC.

8.2. Evaluación de la infiltración de células mieloides en el área infartada

8.2.1. Citometría de flujo

En el día 4 luego de la inducción del IAM, los animales fueron sacrificados con CO₂ y se tomaron muestras de corazón que fueron lavadas y cortadas en PBS. Luego se realizó una digestión enzimática en PBS suplementado con colagenasa tipo I 450 U/mL, colagenasa tipo XI 125 U/mL, hialuronidasa 60 U/mL, DNAasa I 60 U/mL, HEPES 20 mM y CaCl₂ 5 mM, durante 1 h a 37 °C, con agitación continua a 700 rpm (Thermomixer R, Hamburgo, Alemania). Para terminar la reacción, se incubó la mezcla con 50 µL de EDTA 0,1 M durante 3 min en hielo. La suspensión obtenida fue filtrada a través de una membrana de nylon de 40 µm, centrifugada a 500 g durante 7 min a 4 °C y lavada con PBS/BSA 0,1% P/V. Se cuantificó el número total de leucocitos en una cámara de Neubauer luego de la lisis de los glóbulos rojos y se caracterizaron las

distintas subpoblaciones mediante citometría de flujo, como se describió en el punto 7.6 de esta sección (Hilgendorf y col., 2014).

8.2.2. *Inmunohistoquímica*

En el día 7 luego de la inducción del IAM, los corazones fueron embebidos en Tissue-Tek® O.C.T., congelados en 2-metilbutano y cortados en secciones de 6 μm de espesor en un criostato. La infiltración de leucocitos inflamatorios en el área de infarto se evaluó mediante una tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo de oveja anti-CD11b de ratón y las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa ImageJ (Hilgendorf y col., 2014).

9. *Cuantificación de proteínas*

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Lowry y col. (1951), que se fundamenta en la detección espectrofotométrica del producto de la reacción entre las proteínas presentes en la muestra con Cu^{2+} en medio alcalino, en presencia del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin-Ciocalteu). Una alícuota de las muestras se incubó con Na_2CO_3 2% P/V, NaOH 0,1 N, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% P/V y tartrato de Na^+ y K^+ 2% P/V por 10 min. Luego se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu en una dilución 1:3 y se incubó durante 30 min en la oscuridad. Una vez desarrollado el color, se determinó la absorbancia a 625 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Hitachi U-200. Se realizó una curva de calibración utilizando BSA como estándar, en un rango de 0 a 0,3 mg/mL.

10. *Estadística*

Los resultados se presentan como la media \pm desvío estándar de la media (SEM) y representan el promedio de un mínimo de 6 experimentos independientes. Para analizar las diferencias entre dos grupos, se utilizó el test *t*-Student para muestras no pareadas. Para comparar diferencias entre más de dos grupos experimentales, se realizó un test de ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls. Se consideró estadísticamente significativa una diferencia con $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

11. *Drogas y reactivos*

Las drogas sólidas y reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), excepto los que se enumeran a continuación. Los solventes orgánicos se adquirieron en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Las sondas fluorescentes DiOC₆, NAO y DAF-2 fueron adquiridos en Life Technologies (Eugene, OR, Estados Unidos). El clodronato fue provisto por el VU University Medical Center (Ámsterdam, Países Bajos) y el Infliximab (Remicade®) por Janssen Biotech Inc. (Horsham, PA, Estados Unidos). El anticuerpo bloqueante anti-CD16/CD32 y los anticuerpos conjugados anti-CD45-PacBlue, anti-CD11b-FITC y -AlexaF700, anti-CD11b-CBRM1/5-FITC, anti-CD115-APC y -PE, anti-Gr-1-APC-Cy7 y -PE-Cy7,

anti-F4/80-PE y -Pe-Cy7, anti-CD3-BV500, anti-ICAM-1-PE, anti-VCAM-1-FITC, anti-P-Selectina-APC y E-Selectina-APC-Cy7 fueron adquiridos en eBioscience (San Diego, CA, Estados Unidos). El CellFIX® y los anticuerpos conjugados anti-TNF- α -PE y anti-IL-6-PerCP-Cy5.5, así como los anticuerpos anti-CD31, anti-CD102 y anti-CD11b fueron adquiridos en BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). La colagenasa fue adquirida en Worthington (Lakewood, NJ, Estados Unidos). El medio de cultivo DMEM de alto contenido en glucosa fue adquirido en Lonza (Basilea, Suiza), mientras que el medio de cultivo RPMI Gibco®, la tripsina-EDTA Gibco® y la Acutasa® fueron adquiridos en Life Technologies (Eugene, OR, Estados Unidos). El 2-metilbutano fue adquirido en Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, Estados Unidos) y el medio de montaje Tissue-Tek® O.C.T. en Sakura Finetek (Torrance, CA, Estados Unidos). Los anestésicos ketamina y xilacina fueron adquiridos en Holliday-Scott y Richmond Vet Pharma (Buenos Aires, Argentina), respectivamente, mientras que el isoflurano fue adquirido en Abbott (North Chicago, IL, Estados Unidos).

Sinopsis

Numerosos estudios epidemiológicos indican que la exposición al MP se encuentra asociada a incrementos en la morbilidad y mortalidad por diversas afecciones cardiovasculares, y se ha sugerido que alteraciones del metabolismo oxidativo y energético cardíaco podrían relacionarse con los efectos adversos descritos. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos subyacentes a estas observaciones, ni de su relación con las alteraciones de la función cardíaca reportadas. Este capítulo tiene como objetivo estudiar el metabolismo oxidativo y energético cardíaco en ratones expuestos a ROFA, con especial foco sobre la función mitocondrial, y su impacto sobre el trabajo contráctil.

1.1. Metabolismo oxidativo y energético cardíaco

1.1.1. Consumo de O_2 en cortes de tejido

La homeostasis intracelular del O_2 , junto con la de ATP, tienen una importante relevancia funcional para la célula. En el miocito, la concentración de estas dos especies se mantiene invariable a pesar de incrementos de 25 a 100 veces en el trabajo cardíaco (Boveris y Boveris, 2007). A pesar de estos grandes cambios en los requerimientos energéticos, el consumo de O_2 tisular guarda en todo momento una correlación positiva con la tasa metabólica del tejido (Hochachka, 1999). De esta manera, la determinación del consumo de O_2 en cortes de tejido brinda información acerca del estado metabólico del órgano entero, y se utilizó en este estudio como primer acercamiento a la evaluación del metabolismo oxidativo y energético cardíaco en ratones expuestos a ROFA de forma aguda, en un período de 1 a 5 h posteriores a la instilación. En la Figura 31 se muestra un trazo representativo del ensayo, realizado en muestras provenientes de ratones control e instilados con una suspensión de ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento.

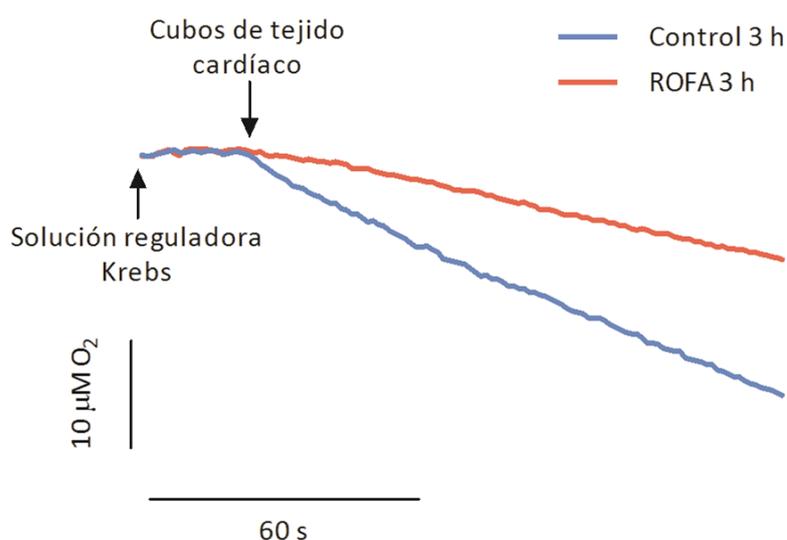


Figura 31. Trazo representativo obtenido durante la evaluación del consumo de O_2 cardíaco mediante respirometría de alta resolución. Se utilizaron cortes de tejido de 1 mm^3 provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento.

Como se muestra en la Figura 32, la instilación intranasal de ROFA produjo una disminución significativa del 23% en el consumo de O₂ cardíaco en comparación con el grupo control, 1 h luego del tratamiento (control 1 h: 1200 ± 100 ng-at O/min g tejido, $p < 0,05$). A las 3 h, la disminución alcanzó el 35% en los animales expuestos a ROFA con respecto al grupo instilado con solución salina (control 3 h: 1200 ± 70 ng-at O/min g tejido, $p < 0,01$). Transcurridas 5 h luego del tratamiento, se observó una recuperación del consumo de O₂ en los ratones expuestos a ROFA en comparación con los valores correspondientes a este grupo a las 3 h (ROFA 3 h: 760 ± 60 ng-at O/min g tejido, $p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas entre los valores correspondientes a los grupos control en los distintos tiempos evaluados, ni con el grupo ROFA a las 5 h. Estos resultados indican que una exposición aguda a ROFA induce una disminución progresiva del consumo de O₂ cardíaco, que llega a un mínimo a las 3 h. Este efecto parecería ser reversible, ya que transcurridas 5 h luego del tratamiento no se observan diferencias significativas entre los valores correspondientes a los animales control e instilados con la suspensión de ROFA.

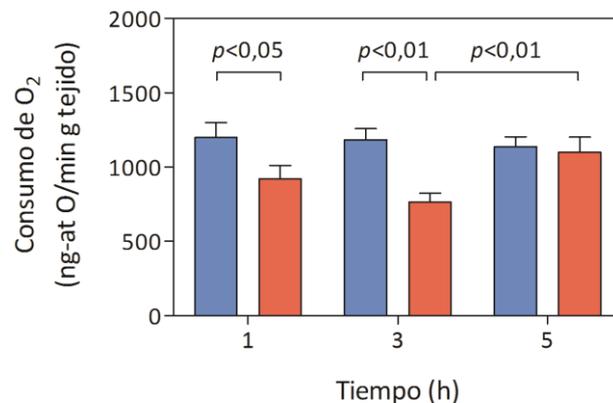


Figura 32. Curso temporal del consumo de O₂ cardíaco en cortes de tejido de 1 mm³, provenientes de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■) mediante instilación intranasal en una única dosis. Las muestras de tejido fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

Dado que las diferencias más marcadas en el consumo de O₂ cardíaco se observaron a las 3 h luego de la exposición a ROFA, este tiempo fue seleccionado para el estudio en profundidad del metabolismo oxidativo y energético cardíaco, así como para la evaluación de la relación de éstos con la función contráctil cardíaca.

1.1.2. Marcadores de daño oxidativo a macromoléculas

Con el objetivo de analizar si la disminución del consumo de O₂ tisular podría encontrarse asociada a la ocurrencia de estrés oxidativo, se evaluaron los niveles de marcadores de daño oxidativo a macromoléculas en homogeneizados de corazón. El ensayo de TBARS es un método utilizado frecuentemente como indicador del daño oxidativo a lípidos, mientras que el contenido de grupos carbonilo es el acercamiento clásico a la evaluación de la oxidación de proteínas (Boveris y Navarro,

2008). Como se muestra en la Figura 33, no se observaron diferencias significativas en los niveles de estos marcadores en las muestras provenientes de los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control.

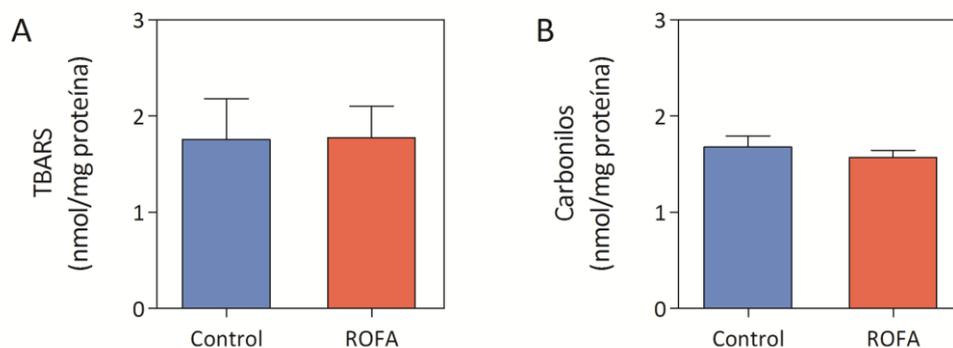


Figura 33. (A) Evaluación fluorométrica del contenido de TBARS y (B) determinación espectrofotométrica del contenido de carbonilos, en homogeneizados de corazón de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento.

1.1.3. Función mitocondrial

En condiciones fisiológicas, el 85-90% del O_2 tisular es utilizado por la mitocondria, y su consumo se encuentra acoplado a la síntesis de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa (Boveris y Boveris, 2007). Por esta razón, y con el objetivo de analizar la disminución observada en el consumo de O_2 cardíaco en los ratones expuestos a ROFA, se evaluó la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de corazón.

1.1.3.1. Respiración mitocondrial

El análisis del consumo de O_2 en mitocondrias aisladas es el acercamiento clásico para el estudio de la función mitocondrial. En la Figura 34 se muestra un trazo representativo correspondiente a la evaluación de la respiración mitocondrial, para mitocondrias aisladas de corazón de ratones control e instilados con una suspensión de ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento.

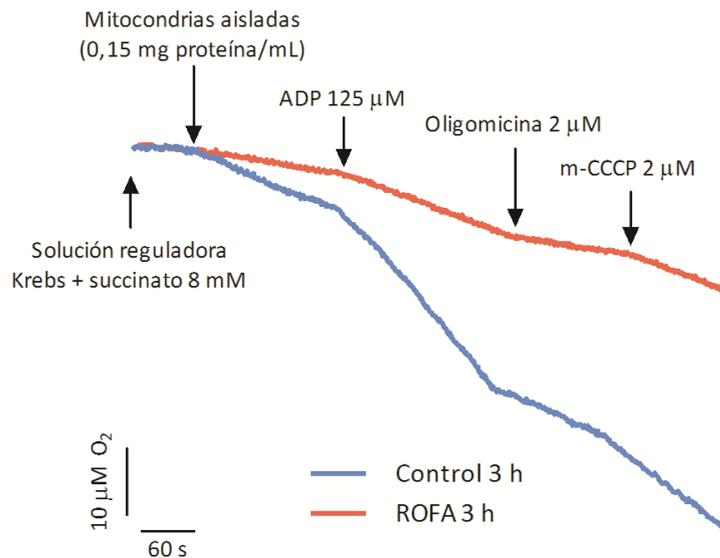


Figura 34. Trazo representativo obtenido durante la evaluación del consumo de O_2 en mitocondrias aisladas de corazón, por respirometría de alta resolución. Se utilizaron muestras provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento.

Como se muestra en la Tabla 1, la velocidad de respiración pasiva mitocondrial (Estado 4) disminuyó significativamente en un 30% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control ($p < 0,01$). Asimismo, se observó una disminución significativa del 24% en el estado de respiración activa (Estado 3) de mitocondrias provenientes de ratones expuestos a ROFA ($p < 0,05$). No se observaron diferencias en el CR entre ambos grupos estudiados. Estos resultados sugieren una alteración de la función mitocondrial, principalmente durante el estado de respiración activa, que podría ser la causante de la disminución observada en el consumo de O_2 a nivel tisular en los ratones expuestos a ROFA.

Tabla 1: Evaluación del consumo de O_2 en mitocondrias aisladas de corazón de ratón, obtenidas 3 h luego de una exposición aguda a ROFA.

Estado metabólico	Control (ng-at O/min mg proteína)	ROFA
Estado 4	88 ± 5	61 ± 4**
Estado 3	240 ± 20	180 ± 20*
CR (Estado 4/Estado 3)	2,7	2,9
Estado 4 _o	90 ± 10	50 ± 5 ^{##}
Estado 3 _u	250 ± 20	190 ± 10 ^{§§}

* $p < 0,05$ versus Control Estado 3, ** $p < 0,01$ versus Control Estado 4

^{##} $p < 0,01$ versus Control Estado 4_o, ^{§§} $p < 0,01$ versus Control Estado 3_u

Para analizar en profundidad esta alteración, se evaluó además el consumo de O_2 mitocondrial en presencia de oligomicina y de m-CCCP. Al agregar oligomicina a mitocondrias aisladas e incubadas en estado de respiración activa, se induce la inhibición de la síntesis de ATP y, consecuentemente, disminuye la velocidad de consumo de O_2 mitocondrial a un mínimo. Los valores registrados en esta

situación, conocida como Estado 4_o (Estado $4_{Oligomicina}$), dependen casi exclusivamente de la integridad de la membrana interna mitocondrial y, en menor medida, de la velocidad de oxidación de los sustratos en la cadena respiratoria (Brand y Nicholls, 2011). Al inducir el Estado 4_o en las muestras estudiadas, se observa que la velocidad de consumo de O_2 se acerca a los valores correspondientes al Estado 4 para el mismo grupo. Esto indica integridad de la membrana interna mitocondrial y la utilización de un procedimiento adecuado de aislamiento. Por otro lado, se observó una disminución significativa del 46% en el Estado 4_o en las muestras provenientes del grupo expuesto a ROFA con respecto al control ($p < 0,01$), lo que sugiere una alteración a nivel de la utilización de los sustratos por la cadena respiratoria (Tabla 1).

El agregado de m-CCCP produce un desacoplamiento entre el consumo de O_2 y la síntesis de ATP mitocondrial, disipando el $\Delta\Psi_m$ y llevando así el consumo de O_2 a su valor máximo. Esta nueva situación se conoce como respiración mitocondrial desacoplada o Estado 3_U (Estado $3_{Uncoupled}$). El Estado 3_U depende exclusivamente de la velocidad de oxidación de los sustratos en la cadena respiratoria y de la velocidad de transferencia de los electrones a través de la misma. Así, representa la máxima velocidad de consumo de O_2 que puede alcanzar la mitocondria (Brand y Nicholls, 2011). El Estado 3_U disminuyó significativamente en un 51% en mitocondrias provenientes de ratones expuestos a ROFA con respecto al control ($p < 0,01$). Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la alteración de la funcionalidad mitocondrial se debe a una inhibición a nivel de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los animales instilados con la suspensión de ROFA.

1.1.3.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

En función de los resultados obtenidos en el análisis del consumo de O_2 mitocondrial, y teniendo en cuenta una posible inhibición a nivel de los complejos de la cadena respiratoria en el grupo expuesto a ROFA, se evaluó la actividad *in vitro* de cada uno de ellos por separado. Se utilizaron preparaciones de membranas mitocondriales obtenidas a partir de las mitocondrias aisladas en la sección anterior. Como se muestra en la Tabla 2, la actividad del Complejo II mitocondrial disminuyó significativamente en un 25% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control ($p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas en la actividad de los Complejos I y IV entre los grupos estudiados. Estos resultados indican una inhibición a nivel del Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial en los animales expuestos a ROFA.

Tabla 2: Evaluación espectrofotométrica de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Las mediciones se realizaron en membranas mitocondriales de corazón, obtenidas 3 h luego de una exposición aguda a ROFA.

	Complejo I (nmol/min mg proteína)	Complejo II (nmol/min mg proteína)	Complejo IV (k'/mg proteína)
Control	310 ± 10	87 ± 5	24 ± 2
ROFA	320 ± 20	65 ± 5**	23 ± 1

** $p < 0,01$ versus Control

1.1.3.3. Evaluación del $\Delta\Psi_m$

El gradiente electroquímico de protones que se establece a través de la membrana interna mitocondrial por acción de los complejos de la cadena respiratoria es la fuerza impulsora de la síntesis de ATP mitocondrial. Por lo tanto, la determinación del $\Delta\Psi_m$ constituye otro aspecto clave cuando se estudia la funcionalidad de esta organela. La medida se realizó mediante citometría de flujo en muestras de mitocondrias aisladas, en presencia de DiOC₆. En primer término, la población mitocondrial se separó según la capacidad de las mitocondrias de dispersar la luz (FSC versus SSC, Figura 35A), y se seleccionaron para su estudio los eventos registrados dentro de la población indicada. En cada una de las muestras analizadas, un porcentaje mayor al 98% de los eventos considerados resultaron ser positivos para la marcación con NAO (Figura 35B). Esta sonda se une específicamente a la cardiolipina, indicando que la contaminación de las preparaciones mitocondriales durante el proceso de aislamiento fue mínima.

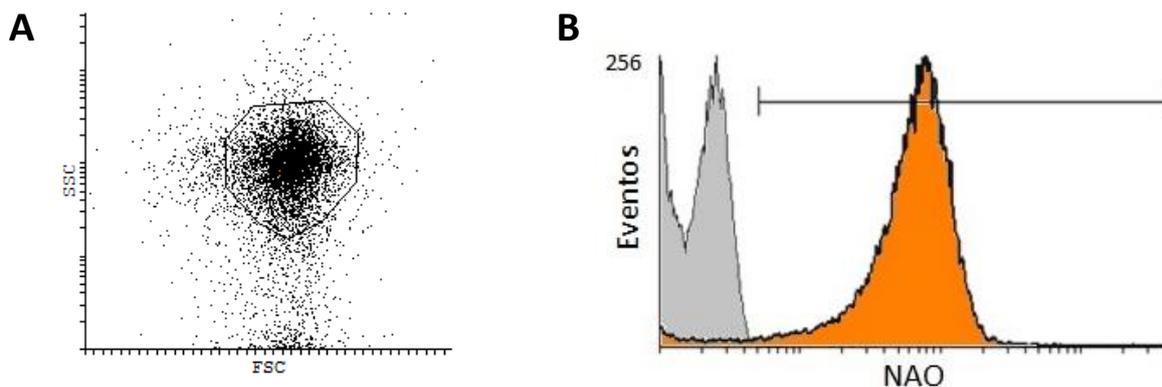


Figura 35. Caracterización de la población mitocondrial utilizada para la evaluación del $\Delta\Psi_m$ por citometría de flujo. (A) Selección de la población de mitocondrias según la capacidad de las partículas mitocondriales de dispersar la luz. (B) Evaluación de la pureza de las preparaciones mitocondriales por tinción selectiva de la cardiolipina en la membrana interna mitocondrial con NAO (■), en comparación con una muestra sin marcar (■).

Como se muestra en la superposición de los histogramas en la Figura 36A, la exposición a ROFA provocó una disminución en la señal de DiOC₆ con respecto al grupo control, tanto en Estado 4 como en Estado 3. La cuantificación de la IFM de DiOC₆ en las distintas condiciones estudiadas (Figura 36B)

muestra que en los ratones expuestos a ROFA existe una disminución significativa del 18% en Estado 4 (IFM control: 44 ± 2 , $p < 0,05$), y del 15% en Estado 3 (IFM control: 35 ± 1 , $p < 0,05$). Esto indica una disminución del $\Delta\Psi_m$ en este grupo, en ambos estados metabólicos. Como control positivo del ensayo, se realizó la misma determinación en presencia de m-CCCP. En estas condiciones, se observó una fuerte caída de la señal de DiOC₆ y, por lo tanto, del $\Delta\Psi_m$ en ambos grupos experimentales.

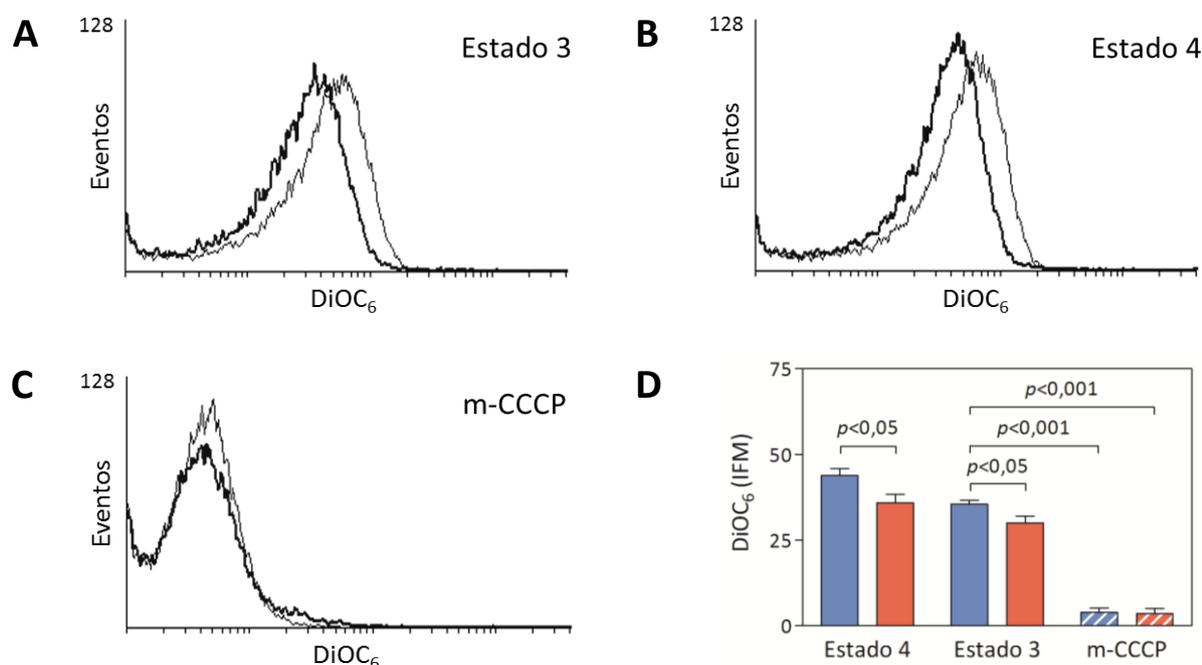


Figura 36. Evaluación del $\Delta\Psi_m$ por citometría de flujo. (A-C) Superposición de histogramas correspondientes a la fluorescencia de DiOC₆ en mitocondrias aisladas de corazón de ratones expuestos a solución salina (línea fina) o a una suspensión de ROFA (línea gruesa) en distintos estados metabólicos. (D) Cuantificación de la fluorescencia de DiOC₆ en la población mitocondrial seleccionada, indicativo del $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias aisladas de corazón de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Mitocondrias incubadas con m-CCCP se utilizaron como control positivo del ensayo.

1.1.3.4. Contenido y producción mitocondrial de ATP

Una alteración en la función mitocondrial puede traducirse en una producción deficiente de ATP. Dado que se observó una disminución del consumo de O₂ en Estado 3 y una caída del $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias aisladas de corazón de ratones expuestos a ROFA, el siguiente paso fue cuantificar la capacidad de producción de ATP por parte de estas mitocondrias. La Figura 37 muestra un trazo representativo para muestras provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA. Para asegurar la especificidad del ensayo, se incluyeron determinaciones en presencia de oligomicina.

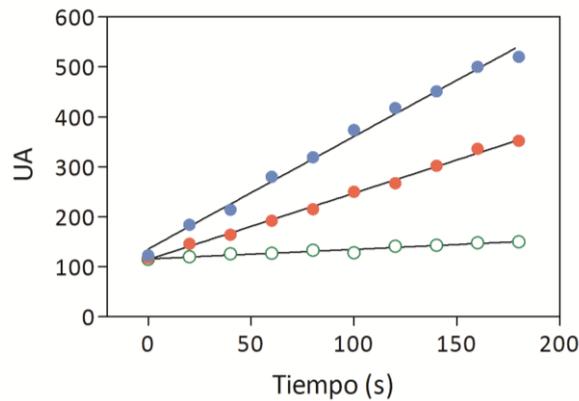


Figura 37. Trazo representativo obtenido durante la evaluación del contenido y velocidad de producción de ATP, mediante una técnica quimioluminiscente basada en el sistema luciferina-luciferasa. Se utilizaron mitocondrias aisladas de corazón de ratones expuestos a solución salina (●) o a una suspensión de ROFA (●), transcurridas 3 h luego del tratamiento. La especificidad del ensayo se evaluó utilizando mitocondrias aisladas e incubadas con oligomicina (○).

Como se muestra en la Tabla 3, no se observaron diferencias en el contenido mitocondrial de ATP transcurridas 3 h luego del tratamiento. Sin embargo, la velocidad de producción de ATP se encontró significativamente disminuida en un 52% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Este resultado indica una producción deficiente de ATP por parte de las mitocondrias de corazón de los ratones expuestos a ROFA.

Tabla 3: Evaluación del contenido y velocidad de producción de ATP en mitocondrias aisladas de corazón, 3 h luego de una exposición aguda a ROFA. Se utilizó un ensayo quimioluminiscente basado en el sistema luciferina-luciferasa.

	Contenido de ATP (nmol/mg proteína)	Producción de ATP (nmol/min mg proteína)
Control	110 ± 10	560 ± 20
ROFA	100 ± 10	290 ± 20*

* $p < 0,05$ versus Control

1.1.3.5. Relación P/O

La relación P/O indica el número máximo de moléculas de ATP que se sintetizan por cada átomo de O consumido durante la respiración mitocondrial. Se calcula como el cociente entre la velocidad de producción de ATP y el consumo de O₂ en estado de respiración activa, y es un indicador de la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial. A partir de los datos mostrados en las Tablas 1 y 3, se obtuvo la relación P/O, la cual disminuyó desde un valor de 2,3 para el control a 1,6 para los ratones instilados con la suspensión de ROFA. Esto indica un desacoplamiento entre el consumo de O₂ y la síntesis de ATP mitocondrial en el corazón de los ratones expuestos a ROFA.

1.2. Función cardíaca

Con el objetivo de determinar si las alteraciones metabólicas observadas a nivel tisular y mitocondrial producto de la exposición a ROFA impactan sobre la funcionalidad cardíaca, se evaluaron la PDVI, indicativa de la fuerza contráctil, y el t_{50} , indicativo de la función diastólica. Para ello, se utilizó la técnica de perfusión del órgano aislado desarrollada por Langendorff (Sutherland y col., 2003), y se realizaron mediciones en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO.

1.2.1. Reserva contráctil

Como se muestra en la Figura 38A, no se observaron diferencias significativas entre la PDVI en corazones de ratones expuestos a solución salina o a la suspensión de ROFA, en condiciones basales. Como se observa comúnmente para un miocardio normal, la PDVI aumentó significativamente en un 52% en ratones control luego del estímulo β -adrenérgico (PDVI basal: 77 ± 5 mmHg, $p < 0,05$). Este incremento de la contractilidad se vio significativamente atenuado en los ratones expuestos a ROFA (Figura 38A y 38B), lo que indica una disminución de la reserva contráctil cardíaca en este grupo.

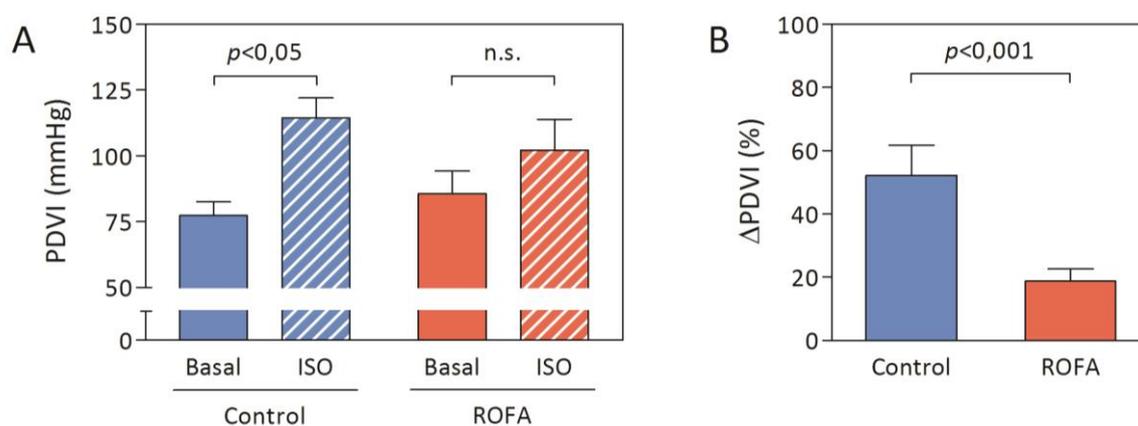


Figura 38: Evaluación de la reserva contráctil cardíaca por la técnica de Langendorff. Las mediciones se realizaron luego de una exposición aguda a ROFA, en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO. (A) Determinación de la PDVI en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA. (B) Incremento de la PDVI (Δ PDVI), expresado como la diferencia porcentual entre la PDVI en condiciones basales y luego del estímulo β -adrenérgico.

1.2.2. Reserva diastólica

La relajación miocárdica, determinada a partir del t_{50} , también se vio alterada luego del tratamiento con ROFA. En los ratones control, como se espera para un miocardio normal, se observó una disminución significativa del 31% en el t_{50} luego del estímulo β -adrenérgico (t_{50} basal: $14,3 \pm 0,5$ s, $p < 0,05$). En los ratones expuestos a ROFA no se registraron diferencias significativas en este indicador, antes y después del estímulo (Figuras 39A y 39B). De hecho, la disminución del t_{50} en este grupo luego del estímulo β -adrenérgico fue de un 3% con respecto a las condiciones basales. Esto sugiere que, así como es el caso para la reserva contráctil, la reserva diastólica cardíaca también se encuentra disminuida en los ratones expuestos a ROFA.

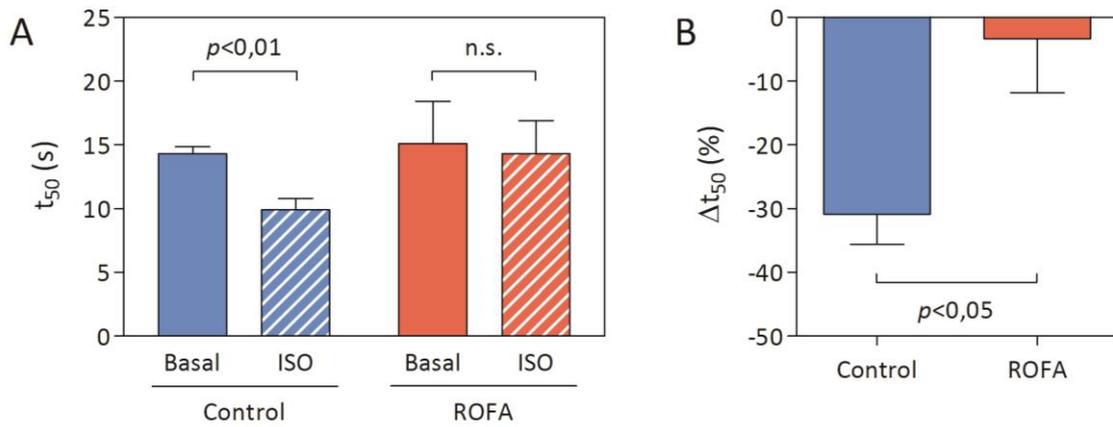


Figura 39: Evaluación de la reserva diastólica cardíaca por la técnica de Langendorff. Las mediciones se realizaron luego de una exposición aguda a ROFA, en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO. (A) Determinación del t_{50} en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA. (B) Disminución del t_{50} (Δt_{50}), expresado como la diferencia porcentual entre el t_{50} en condiciones basales y luego del estímulo β -adrenérgico.

1.2.3. Consumo de O_2 cardíaco luego del estímulo β -adrenérgico

Luego del estudio de la función cardíaca, los corazones perfundidos fueron removidos del aparato de Langendorff, y se realizó la evaluación del metabolismo oxidativo de la misma forma que se utilizó en la sección 1.1.1 de este capítulo. El estímulo β -adrenérgico indujo un aumento significativo en el consumo de O_2 tisular en ambos grupos experimentales. Sin embargo, este aumento fue menor para los ratones expuestos a ROFA (33% de incremento con respecto a condiciones basales, $p < 0,05$) en comparación con lo observado para el grupo control (44% de incremento con respecto a condiciones basales, $p < 0,001$). Además, el consumo de O_2 luego del estímulo β -adrenérgico fue un 60% menor en los ratones expuestos a ROFA con respecto a la misma situación correspondiente al grupo control (control ISO: 1700 ± 100 ng-at O/min g tejido, $p < 0,001$) (Figura 40). Estos resultados indican que la exposición aguda a ROFA produce alteraciones en el metabolismo oxidativo cardíaco, no solo en condiciones basales, sino también luego de un estímulo β -adrenérgico con ISO.

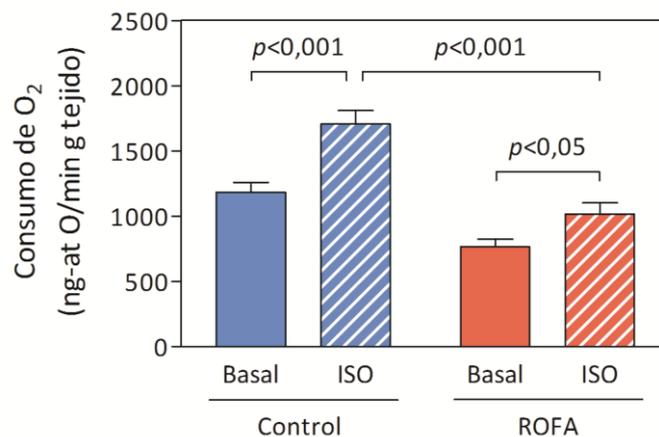


Figura 40: Evaluación del consumo de O_2 cardíaco en cortes de tejido, en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO. Las mediciones se realizaron 3 h luego de una exposición aguda a solución salina o a una suspensión de ROFA, y posteriormente a la evaluación de la reserva contráctil cardíaca.

1.3. Correlación entre el consumo de O₂ y la contractilidad cardíaca

Teniendo en cuenta el consumo de O₂ en cortes de tejido en condiciones basales y luego del estímulo β-adrenérgico (Figura 40), así como la PDVI en ambas condiciones para cada uno de los animales estudiados (Figura 38A), se realizó una correlación entre ambas variables para los ratones instilados con solución salina (Figura 41A) o con una suspensión de ROFA (Figura 41B). Para el grupo de animales control se obtuvo una correlación lineal positiva ($r^2=0,8271$; $p<0,001$), mientras que para el grupo de ratones expuestos a ROFA no se observó dicha correlación ($r^2=0,1396$).

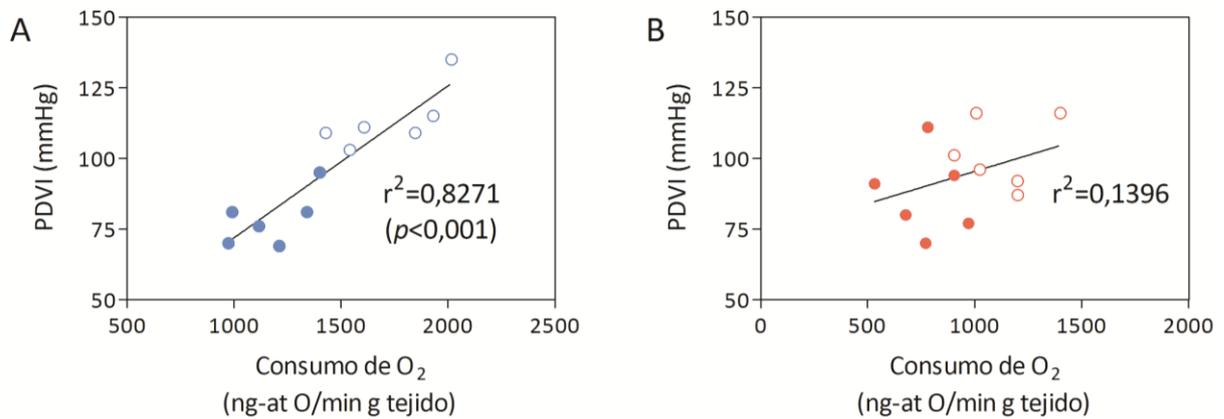


Figura 41: (A) Correlación entre el consumo de O₂ cardíaco y la PDVI en corazones de ratones expuestos a solución salina (●), o (B) a una suspensión de ROFA (●), en condiciones basales (puntos llenos) y luego de un estímulo β-adrenérgico (puntos vacíos).

Este indica que existe una relación directa entre los cambios en el consumo de O₂ y la contractilidad cardíaca en un corazón normal. Sin embargo, esta relación se pierde en los animales expuestos a ROFA.

Sinopsis

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la asociación entre la exposición al MP y los efectos adversos sobre el sistema cardiovascular es la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo sistémico. Este capítulo tiene por objetivo evaluar marcadores plasmáticos de ambos procesos en ratones expuestos a ROFA, estudiar los cambios en sus niveles en función del tiempo, e identificar la posible fuente de liberación de estos mediadores inflamatorios y prooxidantes en respuesta a la instilación intranasal con ROFA.

2.1. Marcadores sistémicos de estrés oxidativo

2.1.1. Daño oxidativo a macromoléculas

Con el objetivo de evaluar la ocurrencia de estrés oxidativo a nivel sistémico luego de una exposición aguda a ROFA se determinaron, como primera medida, los niveles plasmáticos de marcadores de daño oxidativo a lípidos (TBARS) y proteínas (contenido de grupos carbonilo). Como se muestra en la Figura 42, la exposición aguda a ROFA produjo un aumento en ambos marcadores. Sin embargo, los cambios observados en los niveles de los mismos difieren temporalmente. Por un lado, se observó un aumento significativo del 16% en el contenido de TBARS en plasma de ratones expuestos a ROFA con respecto al control, transcurrida 1 h luego del tratamiento (control 1 h: $3,27 \pm 0,09 \mu\text{M}$, $p < 0,01$), y del 19% a las 3 h (control 3 h: $3,37 \pm 0,06 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) (Figura 42A). Por otro lado, el contenido plasmático de proteínas oxidadas aumentó significativamente a las 3 y 5 h luego de la exposición a ROFA, en un 12% (control 3 h: $1,16 \pm 0,03 \text{ nmol/mg proteína}$, $p < 0,01$) y en un 16% (control 5 h: $1,12 \pm 0,04 \text{ nmol/mg proteína}$, $p < 0,01$), respectivamente (Figura 42B). Estos resultados indican un incremento en el daño oxidativo a los lípidos y proteínas del plasma en los ratones expuestos a ROFA.

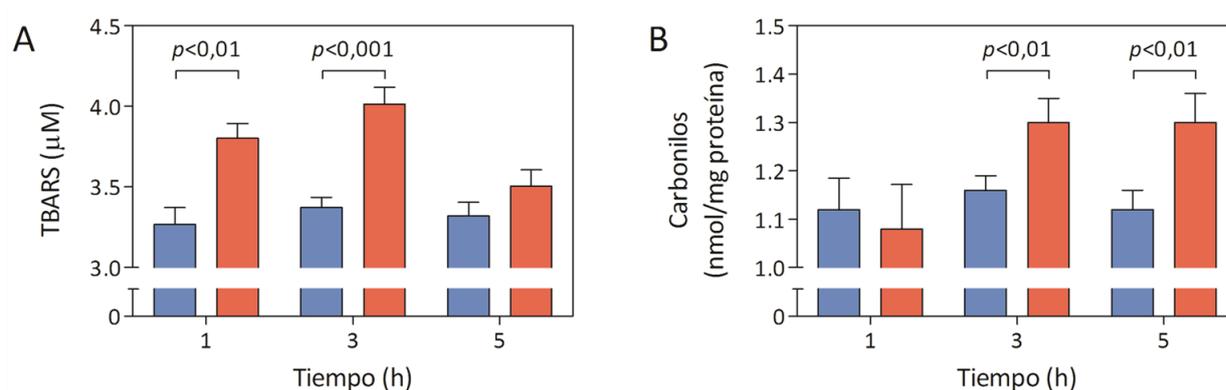


Figura 42. (A) Evaluación fluorométrica del contenido de TBARS y (B) determinación espectrofotométrica del contenido de carbonilos, en plasma de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

2.1.2. Defensas antioxidantes

Para avanzar con la evaluación de la ocurrencia de estrés oxidativo sistémico en los ratones expuestos a ROFA, el siguiente paso fue estudiar los niveles de distintas defensas antioxidantes. Éstas incluyen la determinación de las concentraciones plasmáticas de GSH, GSSG, ácido ascórbico, y de la actividad de SOD.

2.1.2.1. Niveles plasmáticos de GSH y GSSG

La relación GSH/GSSG es uno de los parámetros más frecuentemente utilizados para estudiar el estado redox en células y tejidos (Franco y col., 2007). Como se muestra en la Tabla 4, se observó una disminución significativa del 27% en los niveles plasmáticos de GSH en los ratones expuestos a ROFA con respecto al control, transcurridas 3 h luego del tratamiento. En cuanto a los niveles plasmáticos de GSSG, se encontró un aumento progresivo en los animales instilados con ROFA a los distintos tiempos evaluados. Se observaron diferencias significativas a las 3 y 5 h luego de la exposición, donde los niveles de GSSG se incrementaron en un 42% y 62%, respectivamente. En consecuencia, disminuyó la relación plasmática de GSH/GSSG en los ratones instilados con una suspensión de ROFA con respecto al grupo control, en cada uno de los tiempos evaluados. Estos resultados sugieren la existencia de un entorno más oxidante a nivel plasmático en los ratones expuestos a ROFA.

Tabla 4. Niveles plasmáticos de GSH y GSSG, y relación GSH/GSSG, luego de una exposición aguda a ROFA. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

Tiempo (h)	GSH (μM)		GSSG (μM)		GSH/GSSG	
	CONTROL	ROFA	CONTROL	ROFA	CONTROL	ROFA
1	6,3 \pm 0,5	5,1 \pm 0,4	0,60 \pm 0,05	0,77 \pm 0,08	10,5	6,6
3	6,4 \pm 0,5	4,6 \pm 0,2*	0,59 \pm 0,06	0,84 \pm 0,05**	10,8	5,5
5	6,3 \pm 0,5	5,3 \pm 0,9	0,62 \pm 0,05	0,99 \pm 0,09***	10,2	5,4

* $p < 0,05$ versus GSH Control 3 h, ** $p < 0,01$ versus GSSG Control 3 h, y *** $p < 0,001$ versus GSSG Control 5 h

2.1.2.2. Contenido plasmático de ácido ascórbico

Los niveles plasmáticos de ácido ascórbico disminuyeron significativamente en un 29% y 31% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control, transcurridas 3 h (control 3 h: 53 \pm 4 μM , $p < 0,01$) y 5 h (control 5 h: 51 \pm 3 μM , $p < 0,001$) luego del tratamiento, respectivamente (Figura 43). Este resultado indica un consumo del ácido ascórbico del plasma en los ratones expuestos a ROFA.

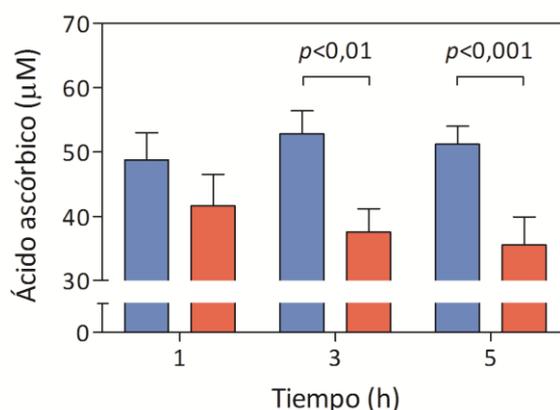


Figura 43. Determinación del contenido de ácido ascórbico por HPLC en plasma de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

2.1.2.3. Actividad plasmática de SOD

La fracción soluble de la EC-SOD que se encuentra anclada a la matriz extracelular, especialmente en la circundante a los vasos sanguíneos, es la que da cuenta de la actividad de SOD observada en plasma (Petersen y col., 2010). La misma disminuyó significativamente en un 38% en los ratones expuestos a ROFA, transcurridas 3 h luego del tratamiento (control 3 h: 90 ± 10 U/L, $p < 0,001$). A las 5 h, la actividad plasmática de SOD se encontró significativamente aumentada en un 44% en los animales expuestos a ROFA con respecto al grupo control (control 5 h: 80 ± 10 U/L, $p < 0,01$) (Figura 44). Estos resultados indican que el consumo de los antioxidantes del plasma luego de la exposición aguda a ROFA también involucra a sistemas antioxidantes enzimáticos, como se puede inferir a partir de la disminución de la actividad de SOD a las 3 h luego del tratamiento. Por otro lado, el aumento observado a las 5 h sugiere la inducción de una respuesta adaptativa a tiempos más prolongados.

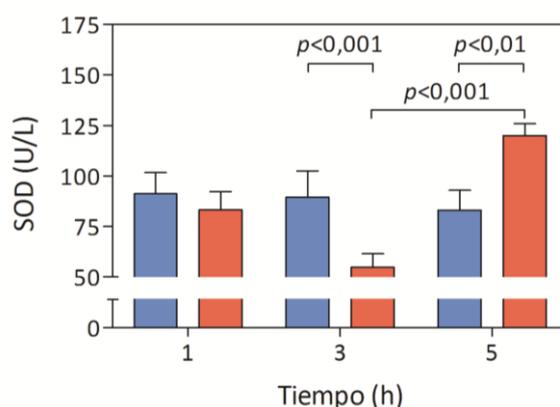


Figura 44. Determinación espectrofotométrica de la actividad de SOD en plasma de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

2.2. Marcadores sistémicos de daño tisular

2.2.1. Actividad plasmática de CK y LDH

Con el objetivo de evaluar si la exposición aguda a ROFA induce algún tipo de daño tisular significativo, además del estrés oxidativo sistémico observado, se evaluaron las actividades de CK y LDH en plasma. Como se muestra en la Tabla 5, no se encontraron diferencias en estos marcadores cuando se compararon los valores correspondientes a las muestras provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, a ninguno de los tiempos considerados. Esto indicaría que el estrés oxidativo sistémico encontrado en los ratones expuestos a ROFA transcurre sin la ocurrencia de daño significativo a nivel del tejido pulmonar o cardíaco.

Tabla 5. Determinación espectrofotométrica de la actividad de CK y LDH en plasma, luego de una exposición aguda a ROFA. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

Tiempo (h)	CK (U/L)		LDH (U/L)	
	CONTROL	ROFA	CONTROL	ROFA
1	220 ± 20	230 ± 10	150 ± 20	150 ± 10
3	230 ± 10	220 ± 10	160 ± 10	170 ± 20
5	250 ± 20	240 ± 20	150 ± 10	150 ± 20

2.3. Evaluación de la respuesta inflamatoria

2.3.1. Perfil plasmático de citoquinas

Para determinar si la instilación intranasal de una suspensión de ROFA induce algún tipo de respuesta inflamatoria a nivel sistémico, se midieron los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IFN- γ en muestras obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento. Los niveles de IL-10 también fueron evaluados, con el objetivo de estudiar la existencia de una respuesta de tipo regulatoria. Por un lado, se observó un incremento significativo de TNF- α e IL-6 en ratones expuestos a ROFA con respecto al control, a todos los tiempos evaluados, con un máximo a las 3 h (Figura 45A y 45B). Ambas citoquinas se encontraron aumentadas aún a las 5 h. Sin embargo, sus niveles en los ratones instilados con ROFA fueron significativamente menores con respecto a aquellos a las 3 h. Por otro lado, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de IL-10 en función del tiempo en ratones instilados con ROFA, con un máximo a las 5 h (Figura 45C). En cuanto a los niveles de INF- γ , no se observaron cambios transcurridas 1 y 3 h luego del tratamiento. Sin embargo, se observó un aumento marcado a las 5 h luego de la exposición a ROFA (Figura 45D).

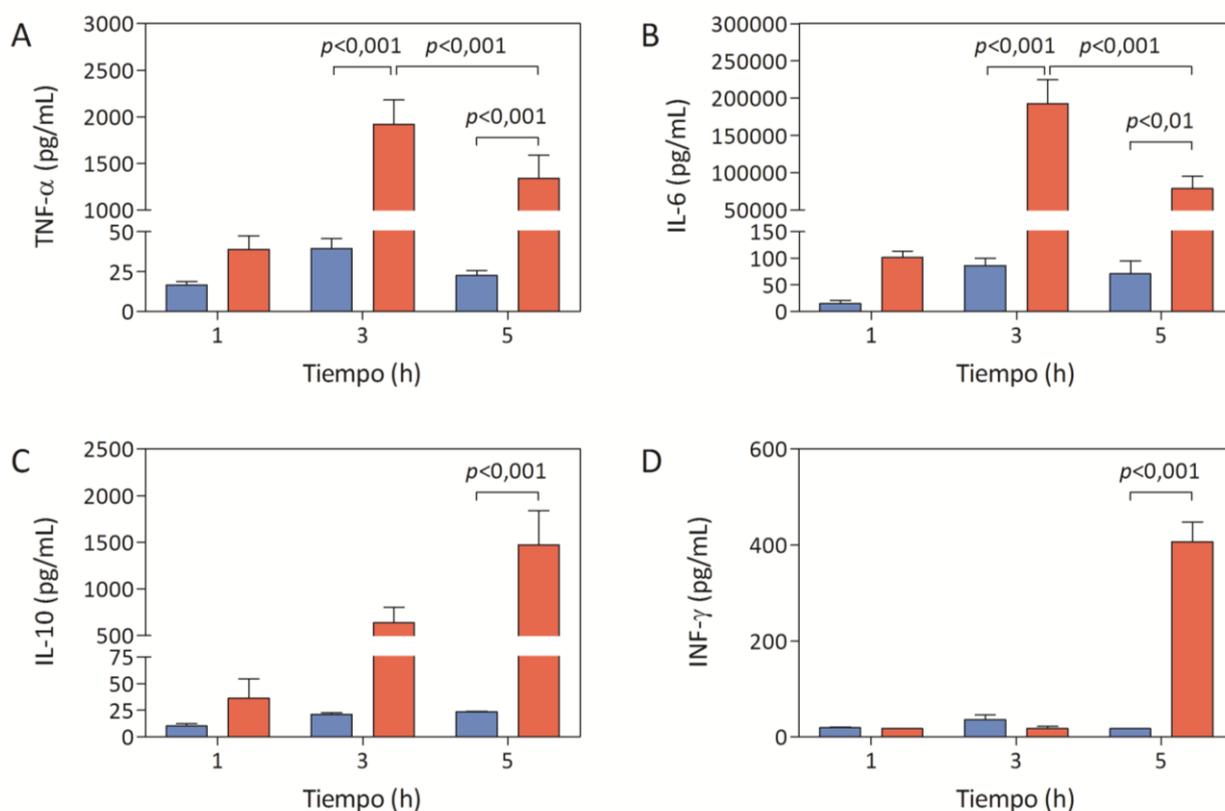


Figura 45. Perfil de citoquinas en plasma de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Determinación de los niveles de (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 y (D) INF- γ mediante ELISA. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

Estos resultados indican que una instilación intranasal de ROFA induce una respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Teniendo en cuenta el tipo de citoquinas involucradas, esta respuesta inflamatoria parecería comprender principalmente a componentes de la inmunidad innata, al menos en las fases iniciales de la misma. Cabe destacar que el pico del aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), al igual que para los marcadores de estrés oxidativo, ocurre a las 3 h luego del tratamiento. Por último, también se observa la inducción de una respuesta inflamatoria de tipo regulatoria trascurridas 5 h luego del tratamiento, como sugiere el aumento de IL-10 en plasma en los ratones expuestos a ROFA.

2.3.2. Perfil de citoquinas en pulmón

Con el objetivo de evaluar la posible contribución de la respuesta inflamatoria local en los cambios observados en los niveles de citoquinas a nivel sistémico, se determinaron las concentraciones de las distintas citoquinas en homogeneizados de pulmón. En los ratones expuestos a ROFA, se observó un aumento significativo de TNF- α e IL-6 a todos los tiempos evaluados, llegando a un máximo a las 3 h (Figura 46A y 46B). Ambas citoquinas se encontraron significativamente aumentadas aún transcurridas 5 h luego del tratamiento. Sin embargo, los niveles de IL-6 en el pulmón de los ratones instilados con

ROFA fueron significativamente menores a los correspondientes a las 3 h. No se observaron cambios en los niveles de IL-10 e INF- γ , a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 46C y 46D).

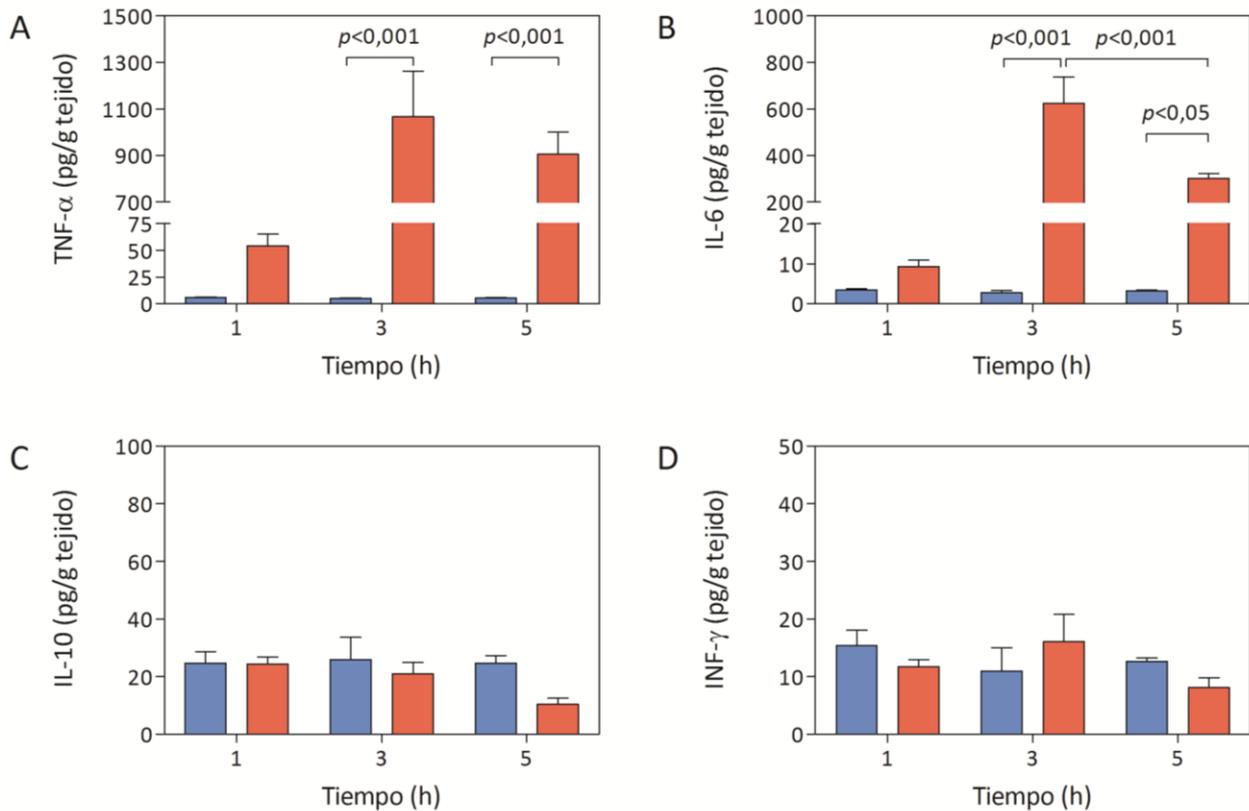


Figura 46. Perfil de citoquinas en homogeneizados de pulmón de ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■). Determinación de los niveles de (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 y (D) INF- γ mediante ELISA. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego del tratamiento.

Estos resultados sugieren que la instilación intranasal de ROFA en forma aguda induce una respuesta inflamatoria y liberación de citoquinas a nivel local, que llega a un máximo a las 3 h luego del tratamiento. Esta situación podría contribuir, al menos en parte, con la respuesta inflamatoria sistémica observada en los ratones expuestos a ROFA.

2.3.3. Activación de leucocitos

Dado que la exposición aguda a ROFA indujo cambios en los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo, así como de inflamación local y sistémica, se evaluó la activación intravascular de leucocitos como posible fuente tanto de especies activas del O₂ como de citoquinas proinflamatorias. Se analizaron los leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) aislados de muestras de sangre proveniente de los animales en estudio, utilizando citometría de flujo y la sonda DCF (Figura 47). No se observaron diferencias significativas en la señal de DCF en la población correspondiente a los leucocitos MN (R1) entre los grupos estudiados, a ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, se observó un incremento paulatino de la señal de DCF en los leucocitos PMN (R2) de las muestras provenientes de los ratones expuestos a ROFA, en comparación con el grupo control (Figura 47B). La cuantificación de la IFM

de DCF en esta población (Figura 47C) mostró aumentos significativos en la oxidación de la sonda en los ratones instilados con ROFA del 24% (1 h), 62% (3 h), y 65% (5 h).

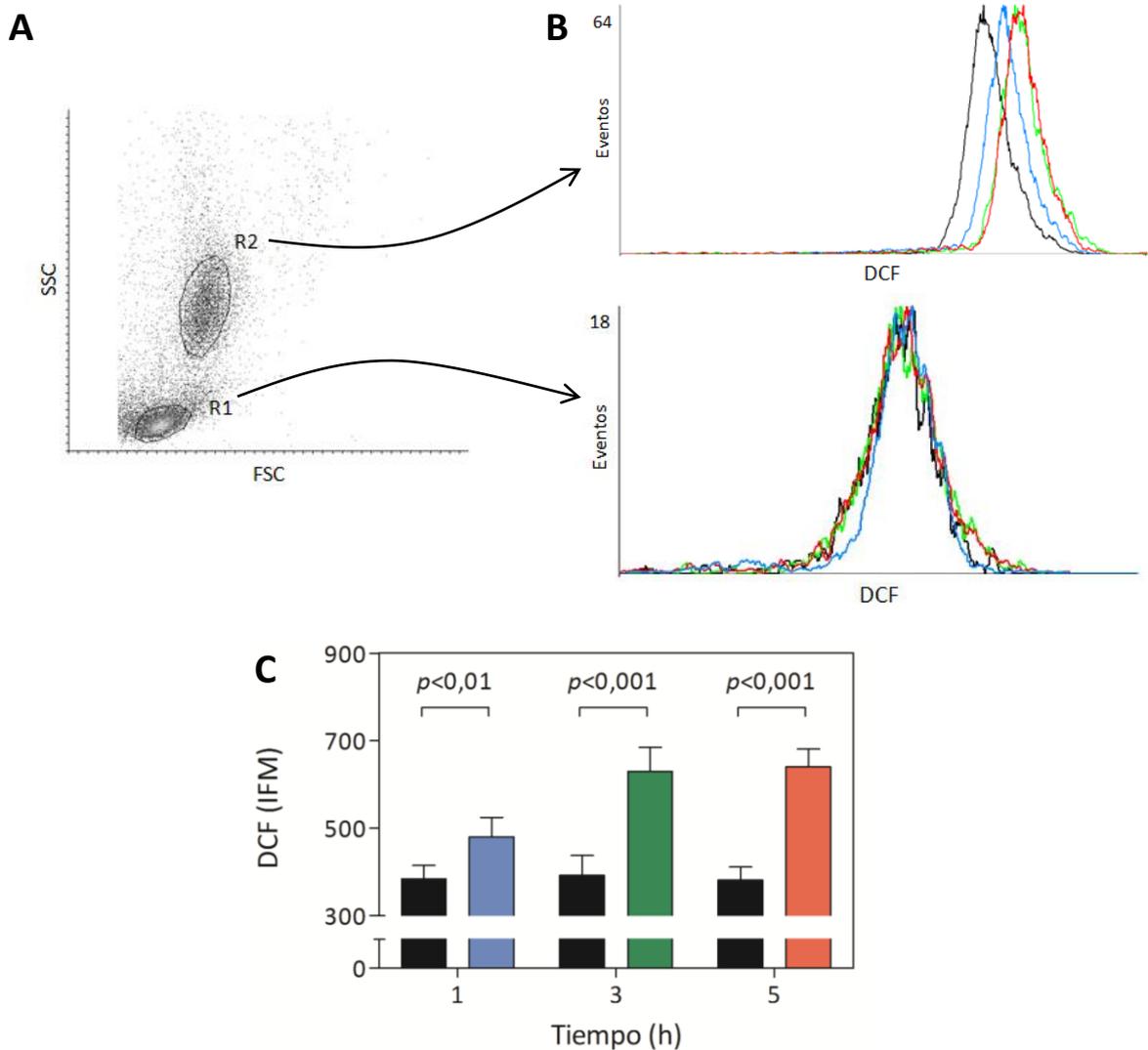


Figura 47. Ensayo de activación de leucocitos por citometría de flujo. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego de una exposición aguda a ROFA. (A) Selección de las poblaciones de leucocitos MN (R1) y PMN (R2) según sus propiedades de dispersión de luz. (B) Superposición de histogramas correspondientes a la fluorescencia de DCF de las poblaciones R1 y R2. (C) Cuantificación de la fluorescencia de DCF de la población R2, indicativo de la activación intravascular de leucocitos PMN. (■) Control, (■) ROFA 1 h, (■) ROFA 3 h y (■) ROFA 5 h.

Este resultado sugiere la activación intravascular de leucocitos PMN en ratones expuestos a ROFA, y un aumento en la producción de especies activas del O_2 en dicho grupo experimental a cuenta de este subtipo celular.

2.3.4. Producción de NO

Se evaluó la producción de NO en las distintas poblaciones de leucocitos utilizando citometría de flujo y la sonda DAF-2. Las mismas se seleccionaron de manera análoga a lo descrito en el punto anterior (Figura 48A). No se observaron diferencias significativas en la población correspondiente a los

leucocitos MN (R1) entre los grupos estudiados. En cuanto a los leucocitos PMN (R2), se observó un aumento de la señal de DAF-2 en las muestras provenientes de ratones expuestos a ROFA en comparación al grupo control (Figura 48B). La cuantificación de la IFM de DAF-2 en esta población (Figura 48C) mostró aumentos significativos en la oxidación de la sonda en los ratones instilados con ROFA del 54% (3 h) y 59% (5 h).

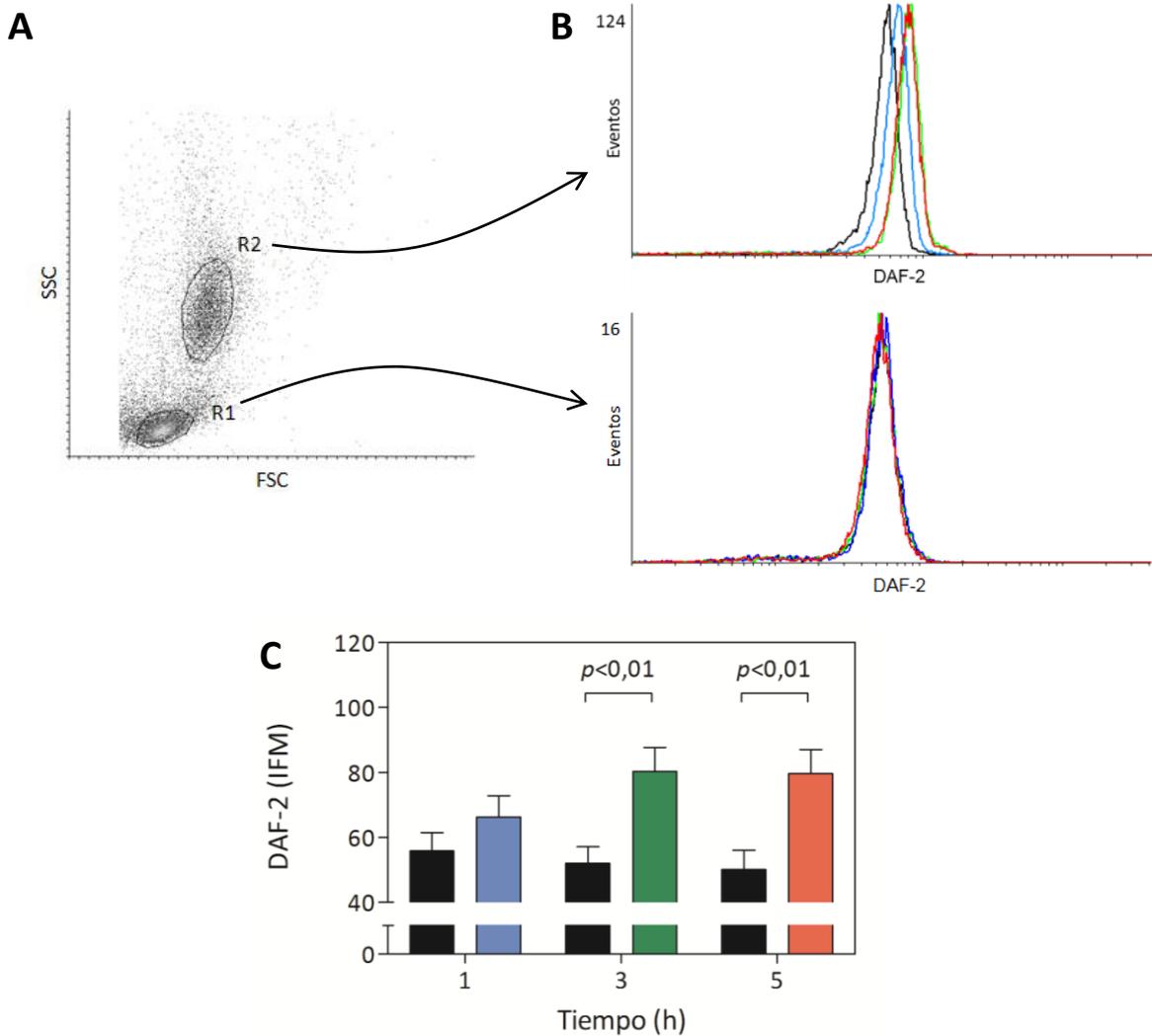


Figura 48. Ensayo de producción de NO en leucocitos por citometría de flujo. Las muestras fueron obtenidas 1, 3 y 5 h luego de una exposición aguda a ROFA. (A) Selección de las poblaciones de leucocitos MN (R1) y PMN (R2) según sus propiedades de dispersión de luz. (B) Superposición de histogramas correspondientes a la fluorescencia de DAF-2 de las poblaciones R1 y R2. (C) Cuantificación de la fluorescencia de DAF-2 de la población R2, indicativo de la producción de NO en leucocitos PMN. (■) Control, (■) ROFA 1 h, (■) ROFA 3 h y (■) ROFA 5 h.

Este resultado indica un incremento en la producción de NO por parte de este subtipo celular en ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control.



Capítulo III

Estudio de la respuesta inflamatoria local y sistémica luego de una exposición aguda a ROFA: Rol de los monocitos e implicancias sobre la progresión del IAM

Sinopsis

La exposición aguda a ROFA induce un aumento en los niveles de citoquinas en pulmón y plasma que sugiere que la inhalación del MP produce una respuesta inflamatoria, tanto local como sistémica. Este capítulo tiene como objetivo identificar los mediadores involucrados en estos procesos, sus principales fuentes, y estudiar los alcances e implicancias de dicha respuesta inflamatoria a nivel sistémico.

Se evaluará, además, la contribución de la exposición a ROFA en la progresión del IAM, la principal causa de muerte asociada a la inhalación del MP.

3.1. Estudio de la respuesta inflamatoria local

En el capítulo anterior se observó un aumento de TNF- α e IL-6 en homogeneizados de pulmón, con un pico máximo a las 3 h luego de la exposición aguda a ROFA (Figura 46). En esta sección se propone estudiar en detalle los mecanismos a través de los cuales ocurre esta respuesta inflamatoria local, analizando muestras de BAL de ratones instilados con solución salina o una suspensión de ROFA.

3.1.1. Infiltración de células inflamatorias en pulmón

Trascurridas 3 h luego de una exposición aguda a ROFA, los animales fueron sacrificados y se tomó una muestra de BAL. Como se observa en la Figura 49A, el número total de células en el BAL aumentó significativamente en un 239% en los animales expuestos a ROFA con respecto al grupo control (control: $7,6 \pm 0,9 \times 10^4$ células, $p < 0,001$). El análisis de las subpoblaciones de leucocitos por citometría de flujo mostró que en el BAL de los animales instilados con ROFA, en comparación con el control, existe una disminución significativa en el porcentaje de macrófagos (control: $84 \pm 9\%$, $p < 0,05$) a cuenta de un aumento en el porcentaje de neutrófilos (control: $10 \pm 3\%$, $p < 0,05$) (Figura 49B). Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria local inducida por la exposición aguda a ROFA induce la infiltración de leucocitos de la serie mieloide en el pulmón.

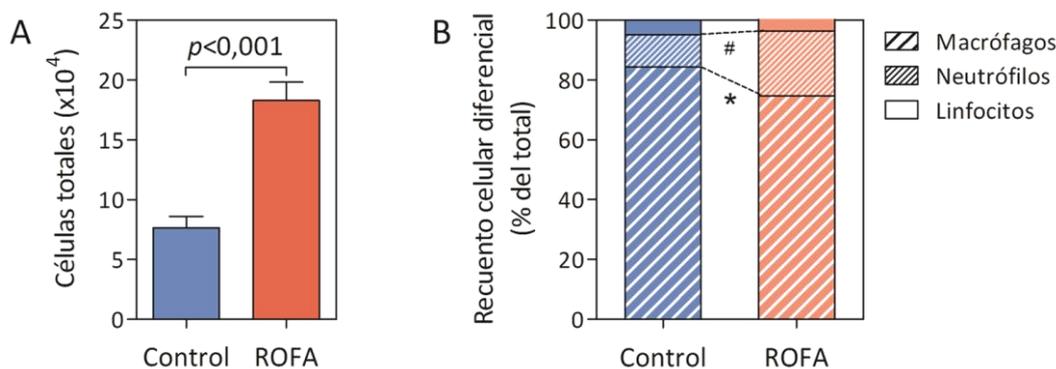


Figura 49. Infiltración de células inflamatorias en el pulmón. (A) Número total de células y (B) recuento celular diferencial en muestras de BAL, obtenidas 3 h luego de una instilación intranasal con solución salina o una suspensión de ROFA. * $p < 0,05$ versus % de macrófagos en el grupo control; y # $p < 0,05$ versus % de neutrófilos en el grupo control.

3.1.2. Perfil de citoquinas en el BAL

Para complementar el estudio de la reacción inflamatoria local inducida por la exposición a ROFA, se evaluaron los niveles de citoquinas en el BAL. Como se puede observar en la Figura 50, se encontraron aumentos significativos en los niveles de citoquinas proinflamatorias en las muestras provenientes de los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control. Los incrementos fueron de 20 veces para TNF- α (control: $0,5 \pm 0,2$ pg/mL, $p < 0,001$), de 30 veces para IL-6 (control: $0,9 \pm 0,5$ pg/mL, $p < 0,01$), y de 16 veces para MCP-1 (control: $1,8 \pm 0,9$ pg/mL, $p < 0,01$).

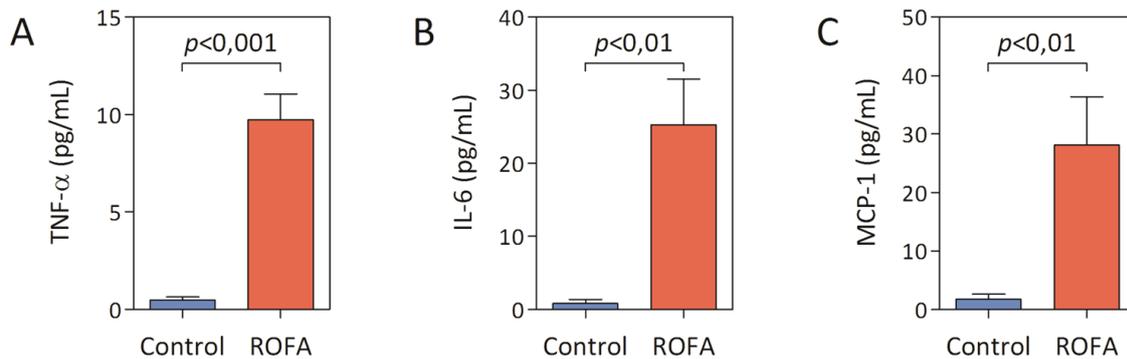


Figura 50. Perfil de citoquinas en muestras de BAL, obtenidas 3 h luego de una instilación intranasal con solución salina o una suspensión de ROFA. Evaluación de los niveles de (A) TNF- α , (B) IL-6 y (C) MCP-1 por el ensayo CBA combinado con citometría de flujo.

3.1.3. Niveles intracelulares de citoquinas proinflamatorias

Para asociar la producción de citoquinas a una determinada subpoblación de leucocitos, se analizaron muestras de BAL combinando la citometría de flujo y la caracterización de los distintos subtipos celulares mediante la marcación de antígenos de superficie, junto con una marcación para citoquinas intracelulares. Como se muestra en la Figura 51A, los niveles intracelulares de TNF- α e IL-6 en macrófagos alveolares (leucocitos F4/80⁺) de ratones expuestos a ROFA fueron significativamente mayores con respecto a lo observado para el grupo control. En cuanto a los neutrófilos (leucocitos Gr-1⁺), también se registraron niveles intracelulares significativamente aumentados de IL-6 en este grupo, aunque no se observaron cambios significativos para TNF- α con respecto al control (Figura 51B). Estos resultados sugieren que los macrófagos son la principal subpoblación de leucocitos involucrada en la producción de citoquinas proinflamatorias en pulmón luego de una exposición aguda a ROFA, y que los neutrófilos contribuyen con la producción de IL-6.

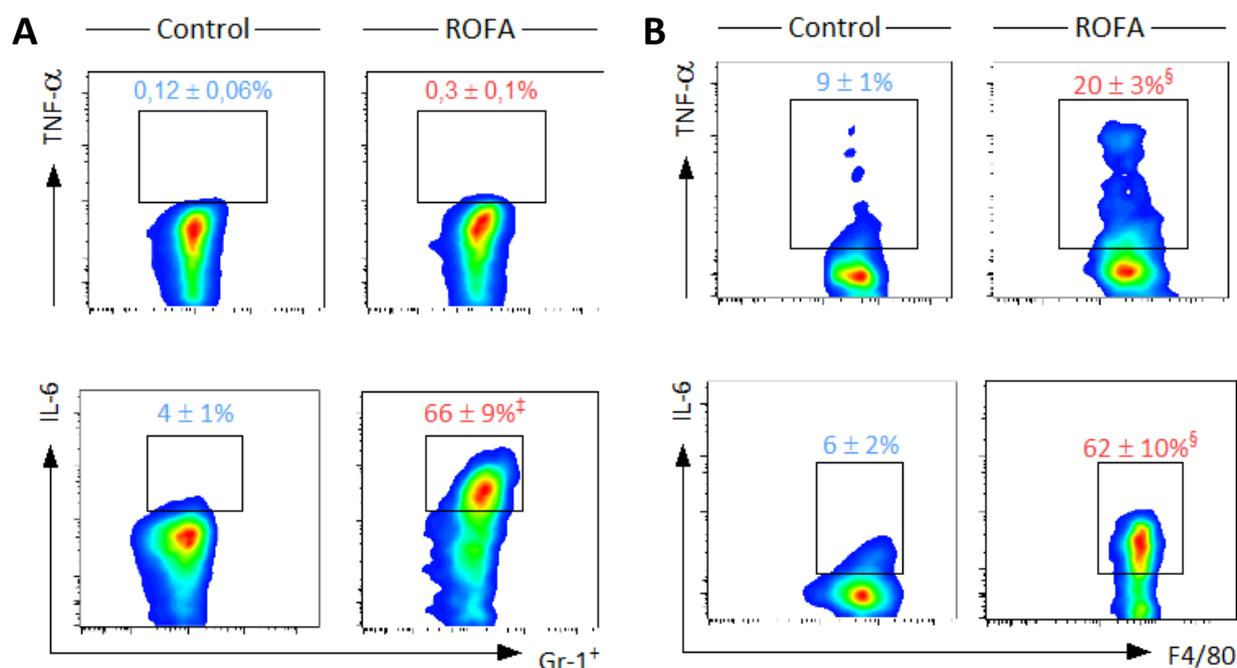


Figura 51. Evaluación de los niveles intracelulares de TNF- α e IL-6 en (A) macrófagos alveolares (leucocitos F4/80⁺) y (B) neutrófilos (leucocitos Gr-1⁺), obtenidos a partir de una muestra de BAL realizada a las 3 h luego de una instilación intranasal con solución salina o una suspensión de ROFA. [§] $p < 0,001$ versus control en leucocitos F4/80⁺; y [‡] $p < 0,001$ versus control en leucocitos Gr-1⁺.

3.2. Alcances de la respuesta inflamatoria sistémica

En la sección 3.1 del Capítulo II se mostró un aumento de TNF- α e IL-6 en plasma, con un pico máximo a las 3 h luego de la exposición aguda a ROFA (Figura 45), indicativo de la ocurrencia de una respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Con el objetivo de evaluar si dicho proceso es capaz de inducir mecanismos inflamatorios remotos como el reclutamiento de leucocitos en circulación periférica, se estudió el tráfico de leucocitos en venas del lecho mesentérico mediante microscopía intravital, así como su infiltración hacia la cavidad peritoneal en un modelo de peritonitis estéril. Además, se estudiaron marcadores *in vivo* de activación de las células involucradas en este fenómeno.

3.2.1. Extravasación de leucocitos en circulación periférica

3.2.1.1. Microscopía intravital

La microscopía intravital es una herramienta útil para estudiar el comportamiento de los leucocitos *in vivo* (Sumen y col., 2004). Transcurridas 3 h luego de una exposición aguda a ROFA, se registró el tráfico de leucocitos en venas del lecho mesentérico de ratones anestesiados (Figura 52A). Como se muestra en la Figura 52B, se observó un aumento significativo de 6 veces en el rodamiento de leucocitos en los animales instilados con ROFA (control: $1,2 \pm 0,3$ leucocitos/100 μm , $p < 0,001$), en comparación con el grupo control. Asimismo, la velocidad media de rodamiento disminuyó significativamente en este grupo (control: 34 ± 2 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,001$) (Figura 52C). Por otro lado, la adhesión

de leucocitos en los ratones expuestos a ROFA también se encontró aumentada de modo significativo en 17 veces, en comparación con el grupo control (control: $0,06 \pm 0,04$ leucocitos/ $100 \mu\text{m}$, $p < 0,001$) (Figura 52D). Como control positivo del ensayo, ratones no instilados fueron inyectados i.p. con 200 ng de TNF- α y fueron analizados luego de 4 h. Estos resultados indican que una exposición aguda a ROFA promueve el rodamiento y la adhesión de leucocitos en circulación sistémica, posiblemente a través de la inducción de la expresión de moléculas de adhesión como consecuencia de los niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias circulantes.

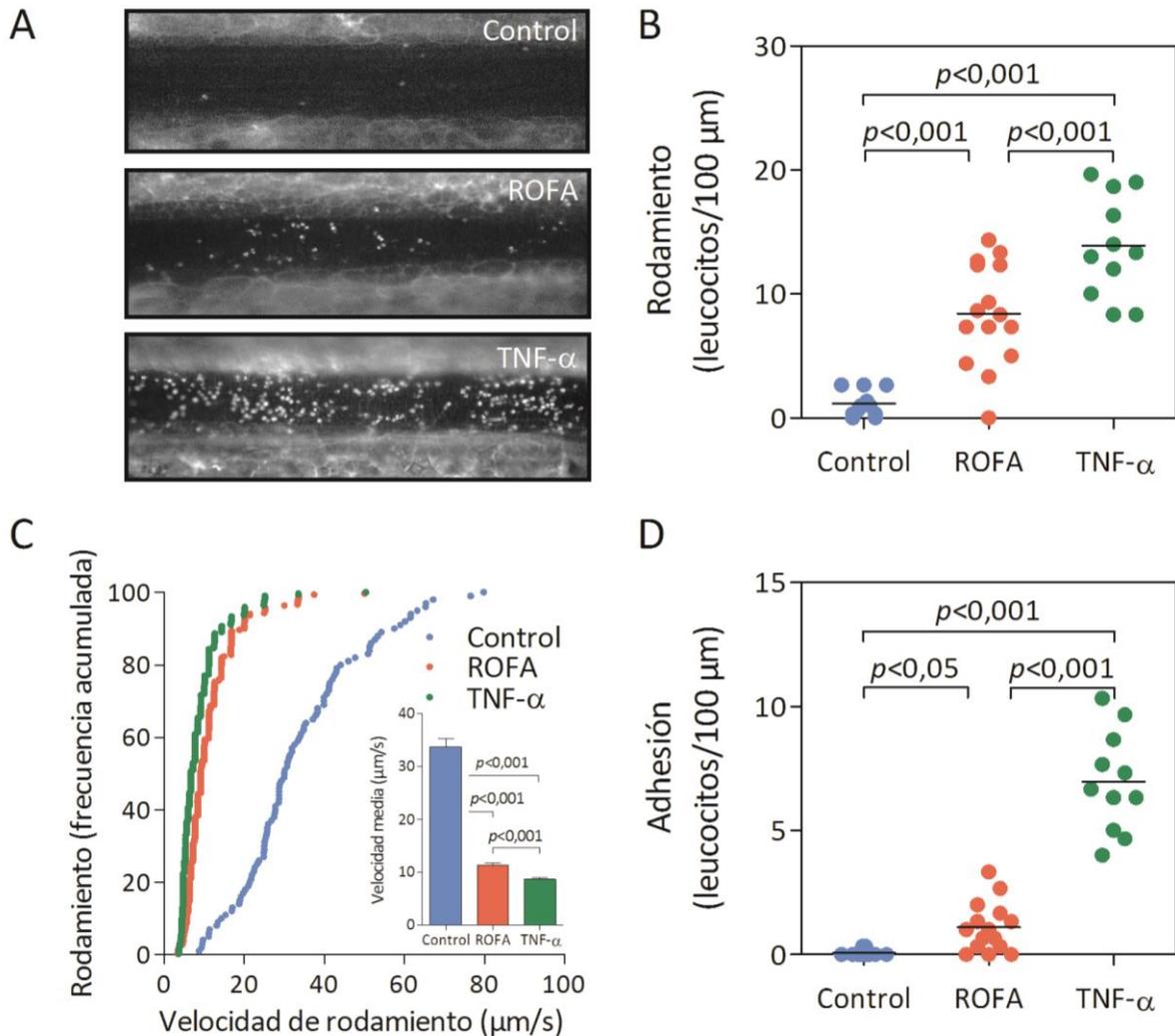


Figura 52. Rodamiento y adhesión de leucocitos en venas del lecho mesentérico de ratones expuestos a solución salina (●) o a una suspensión de ROFA (●). Transcurridas 3 h luego del tratamiento, se anestesiaron los animales, se montó una porción del íleon bajo un microscopio intravital, y se seleccionaron venas de aproximadamente $100 \mu\text{m}$ de diámetro. (A) Visualización del tráfico de leucocitos por tinción con rodamina 3G. (B) Cuantificación del rodamiento, (C) frecuencia acumulada y velocidad media de rodamiento y (D) adhesión de leucocitos. Como control positivo del ensayo, ratones no tratados recibieron una inyección i.p. de 200 ng de TNF- α (●), y se evaluaron luego de 4 h.

3.2.1.2. Peritonitis estéril

La inyección i.p. de caldo tioglicolato en animales de experimentación induce un proceso inflamatorio agudo en la cavidad peritoneal, y es un modelo frecuentemente utilizado para evaluar la

migración de leucocitos desde circulación sistémica (Segal y col., 2002). Para evaluar si la exposición a ROFA afecta la migración de células inflamatorias en este modelo, se cuantificó el número de leucocitos acumulados en la cavidad peritoneal (CEP) luego de una instilación con ROFA. Como se puede observar en la Figura 53, previamente a la inyección i.p. de caldo tioglicolato, la exposición a ROFA no indujo cambios significativos en el número de CEP con respecto al control. Sin embargo, cuando se indujo la peritonitis estéril, la exposición a ROFA provocó un aumento significativo del 74 % en el número de CEP en comparación con el grupo control (control: $8 \pm 1 \times 10^6$ células, $p < 0,01$). Este resultado indica que una exposición aguda a ROFA promueve mecanismos inflamatorios que favorecen la migración de leucocitos a focos de inflamación, aunque no la causan directamente.

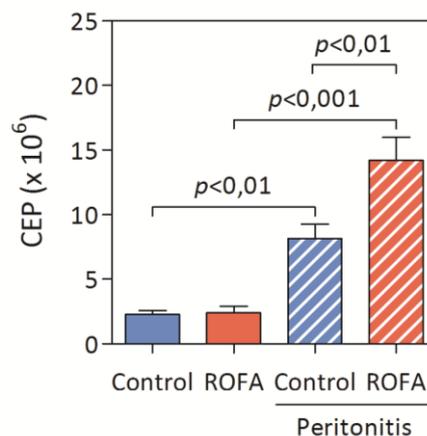


Figura 53. Cuantificación del número de CEP utilizando una cámara de Neubauer. Las muestras de lavado peritoneal se tomaron 3 h luego de una instilación intranasal con solución salina o con una suspensión de ROFA, o luego de la inducción de la peritonitis estéril con caldo tioglicolato.

3.2.2. Marcadores de activación de células mieloides y endoteliales

Para estudiar en detalle los posibles mecanismos involucrados en los resultados observados en los puntos 3.2.1.1 y 3.2.1.2 de esta sección, se evaluaron marcadores de activación de células de la serie mieloide y endoteliales en circulación sistémica utilizando técnicas de citometría de flujo y ELISA, respectivamente. Los marcadores analizados fueron los niveles de expresión y activación de distintas moléculas de adhesión en estos subtipos celulares. Por un lado, se evaluó la abundancia del epitope de activación CBRM1/5 de la integrina leucocitaria CD11b (Mac-1). Como se muestra en la Figura 54A, la activación de CD11b se vio significativamente aumentada en un 26% en neutrófilos (IFM control: 42 ± 3 , $p < 0,05$), y en un 61% en monocitos proinflamatorios Gr-1⁺ (IFM control: 61 ± 7 , $p < 0,05$). Por otro lado, también se observó un incremento significativo en los niveles plasmáticos de la fracción soluble de las moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1 y VCAM-1, en un 25% (sICAM-1 control: 89 ± 4 ng/mL, $p < 0,01$) y 21% (sVCAM-1 control: 158 ± 8 ng/mL, $p < 0,05$), respectivamente (Figura 54B). Estos resultados sugieren que la exposición aguda a ROFA favorece la activación de neutrófilos y monocitos en circulación sistémica, así como de células endoteliales, a través de la inducción de la expresión y activación de moléculas de adhesión en estos subtipos celulares.

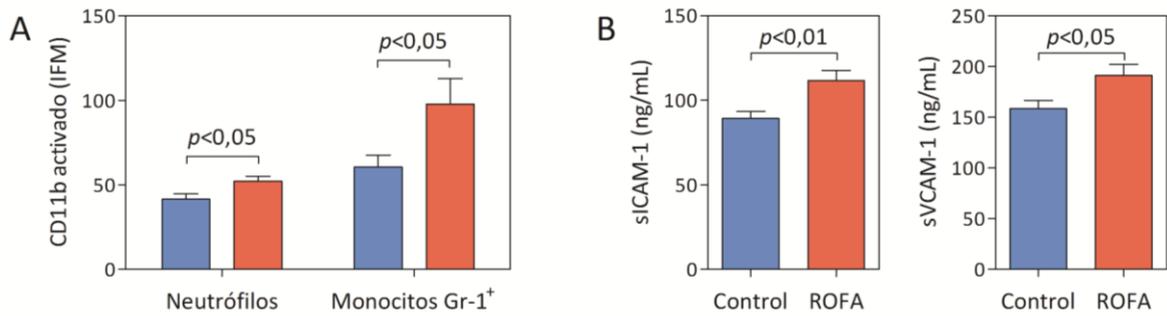


Figura 54. Marcadores *in vivo* de activación de células de la serie mieloide y endoteliales en ratones expuestos a solución salina (■) o a una suspensión de ROFA (■), transcurridas 3 h luego del tratamiento. (A) Evaluación por citometría de flujo de la expresión del epítipo de activación de CD11b (CBRM1/5) en neutrófilos y monocitos Gr-1⁺ circulantes. (B) Determinación de los niveles plasmáticos de la fracción soluble de moléculas de adhesión endoteliales (sICAM-1 y sVCAM-1) mediante ELISA.

3.3. Exposición a ROFA en ratones deficientes en monocitos en circulación periférica

Tanto a nivel local como sistémico, los monocitos y macrófagos parecerían desempeñar un rol importante en el inicio y la progresión de la respuesta inflamatoria inducida por la inhalación de ROFA. Para confirmar esta observación, se repitió el protocolo de exposición a ROFA utilizando ratones deficientes en monocitos en circulación periférica, obtenido mediante una inyección i.v. de clodronato en forma de liposomas (van Rooijen y Hendriks, 2010). Como control del modelo se utilizaron liposomas cargados con PBS. Una vez inducida la depleción de monocitos, los ratones fueron instilados con ROFA y se evaluaron distintos marcadores de respuesta inflamatoria local y sistémica luego de 3 h.

3.3.1. Marcadores de respuesta inflamatoria local

Como se observa en la Figura 55, la administración de clodronato previa a la instilación del MP previno la infiltración de células inflamatorias en el pulmón (Figura 55A). Asimismo, la depleción de monocitos en circulación periférica atenuó significativamente el incremento en los niveles de TNF- α (Figura 55B) e IL-6 (Figura 55C) en las muestras de BAL de ratones instilados con ROFA.

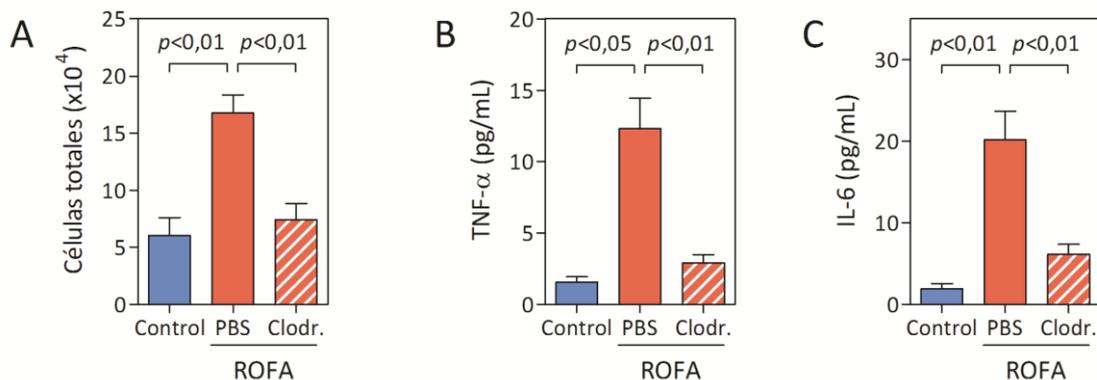


Figura 55. (A) Número total de células y (B) niveles de TNF- α y (C) IL-6 en muestras del BAL provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA. Los animales instilados con el MP fueron tratados previamente con liposomas cargados con clodronato (Clodr.) o PBS según se indica. Las muestras de BAL fueron obtenidas 3 h luego del tratamiento con ROFA. El perfil de citoquinas se realizó mediante el ensayo CBA combinado con citometría de flujo.

3.3.2. Marcadores de respuesta inflamatoria sistémica

En el punto 3.1 del Capítulo II se había mostrado que una exposición aguda a ROFA inducía un aumento en los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6. Semejante a lo observado en el punto anterior, la administración de clodronato previa a la instilación del MP previno dicho aumento de TNF- α (Figura 56A) e IL-6 (Figura 56B) en plasma.

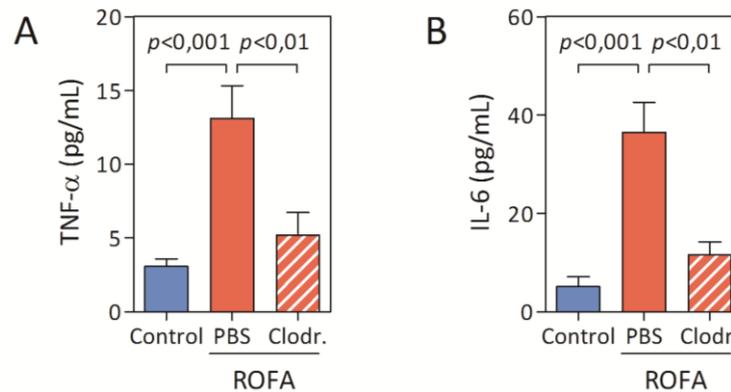


Figura 56. (A) Evaluación de los niveles plasmáticos de TNF- α y (B) IL-6, en ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA. Los animales instilados con el MP fueron tratados previamente con liposomas cargados con clodronato (Clodr.) o PBS según se indica. Las muestras de sangre fueron obtenidas 3 h luego del tratamiento con ROFA. El perfil de citoquinas se realizó mediante el ensayo CBA combinado con citometría de flujo.

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que los monocitos presentes en circulación sistémica cumplen un rol central en los mecanismos inflamatorios inducidos por una exposición aguda al MP, tanto a nivel local como sistémico.

3.4. Rol de la exposición a ROFA en el IAM

El IAM es una patología cardiovascular aguda que posee un importante componente inflamatorio, en donde los monocitos desempeñan un rol preponderante (Nahrendorf y col., 2010). Además, es la principal causa de muerte asociada a la exposición a altos niveles de contaminación ambiental (Brook y col., 2010). Con el objetivo de evaluar la posible contribución de la exposición al MP sobre la progresión del IAM, se utilizó un modelo animal de IAM inducido por ligadura permanente de la arteria coronaria anterior descendente izquierda. Luego, los ratones fueron instilados diariamente con una suspensión de ROFA o con solución salina durante una semana.

En el día 4 luego de la inducción del IAM, un grupo de ratones fue sacrificado y se cuantificó el área de infarto utilizando el método de tinción con TTC. Como se muestra en la Figura 57A, el área de infarto aumentó significativamente en un 21% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo instilado con solución salina (vehículo: 24 ± 1 %, $p < 0,05$). Además, se observó un incremento significativo del 37% en el número de monocitos proinflamatorios Gr-1⁺ en los corazones de los ratones expuestos a ROFA (vehículo: 7000 ± 600 células/mg tejido, $p < 0,05$) (Figura 57B).

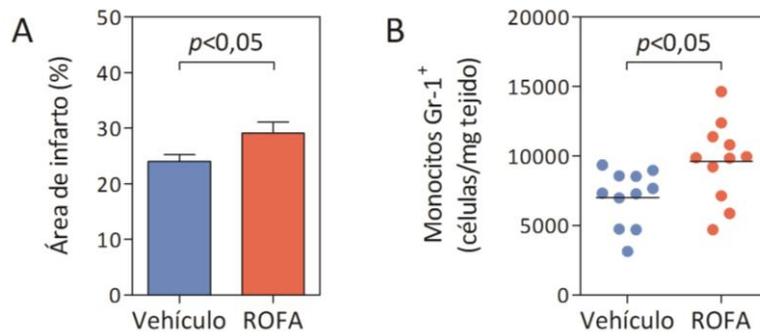


Figura 57. Rol de la exposición al MP en la progresión del IAM, inducido por ligadura permanente de la arteria coronaria anterior descendente izquierda. Los animales fueron instilados diariamente con solución salina o con una suspensión de ROFA. (A) Cuantificación del área de infarto por tinción con TTC y (B) número de monocitos proinflamatorios Gr-1⁺ por citometría de flujo, transcurridos 4 días luego de la inducción del IAM.

En el día 7 luego de la inducción del IAM, otro grupo de ratones fue sacrificado para determinar el área de infarto de forma análoga al punto anterior. Como se muestra en la Figura 58, la misma aumentó significativamente en un 45% en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo instilado con solución salina (vehículo: $23 \pm 2\%$, $p < 0,05$).

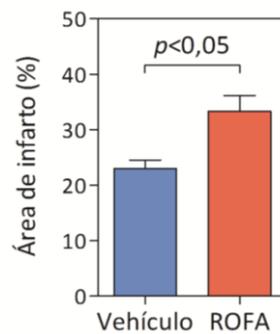


Figura 58. Cuantificación del área de infarto por tinción con TTC, transcurridos 7 días luego de la inducción del IAM. Los animales fueron instilados diariamente con solución salina o con una suspensión de ROFA.

En la Figura 59 se muestra una sección del corazón representativa de esta situación. En la magnificación de la misma, se puede observar que la infiltración de leucocitos CD11b⁺ en el área infartada fue mayor en el grupo instilado con ROFA con respecto al control.

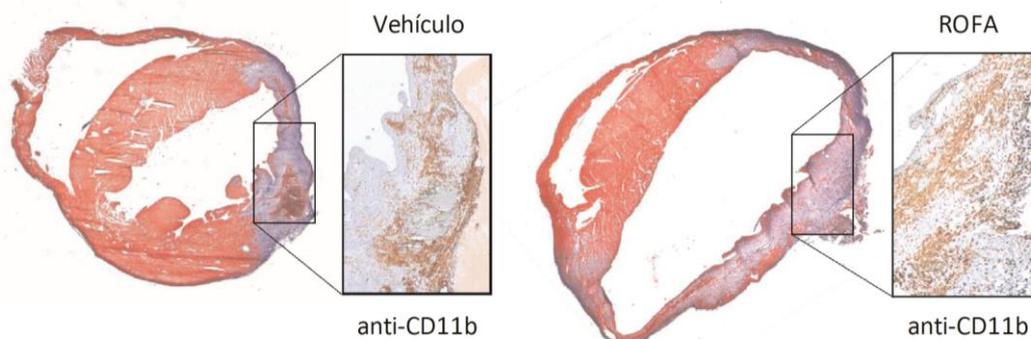


Figura 59. Secciones representativas de corazón de 2 mm, transcurridos 7 días luego de la inducción del IAM. Los animales fueron instilados diariamente con solución salina o con una suspensión de ROFA. La magnificación muestra una tinción inmunohistoquímica para el antígeno pan-mieloide CD11b, indicativo de la infiltración de leucocitos de la serie mieloide en la zona infartada.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la exposición al MP agrava el IAM, y sugieren que un incremento en el reclutamiento de células inflamatorias en la zona infartada podría ser la causa subyacente a dicha observación.

Sinopsis

*La respuesta inflamatoria inducida por una instilación intranasal con ROFA parecería involucrar principalmente la activación de macrófagos en el pulmón, y de células mieloides y endoteliales en circulación periférica. Este capítulo tiene como objetivo clarificar los mecanismos a través de los cuales se produce dicha activación en las distintas poblaciones celulares mencionadas, utilizando distintos acercamientos *in vitro*.*

4.1. Activación de macrófagos

En el capítulo anterior se observó que los macrófagos alveolares parecerían desempeñar un rol importante en la producción local de citoquinas proinflamatorias *in vivo*, luego de una exposición aguda a ROFA. En esta sección se propone evaluar si este efecto puede ser reproducido mediante la incubación *in vitro* de macrófagos con una suspensión de ROFA. Para alcanzar este objetivo, se evaluó la activación de macrófagos en respuesta a una incubación con ROFA, teniendo en cuenta el nivel de expresión y activación de una de sus principales moléculas de adhesión (CD11b), así como la liberación de TNF- α e IL-6 al medio de cultivo.

4.1.1. Nivel de expresión y activación de CD11b

Para evaluar el efecto directo de ROFA sobre la activación de macrófagos, se aisló esta subpoblación celular según se indica en la sección 7.9.1 de Materiales y Métodos, y se incubó con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA en un rango de 0 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio de cultivo. Luego de 24 h, se evaluó el nivel de expresión y activación de CD11b mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 60A, la expresión de CD11b en macrófagos se vio significativamente aumentada en un 62% cuando fueron incubados con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ROFA ($p < 0,001$); mientras que el nivel de activación de CD11b aumentó en un 76% ($p < 0,05$), 97% ($p < 0,05$) y 153% ($p < 0,001$) cuando fueron incubados con 0,001, 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ROFA, respectivamente. En la Figura 60B se puede observar un histograma representativo de esta última condición. Estos resultados indican que las partículas ROFA tienen la capacidad de inducir de forma directa la expresión y activación de moléculas de adhesión en el macrófago.

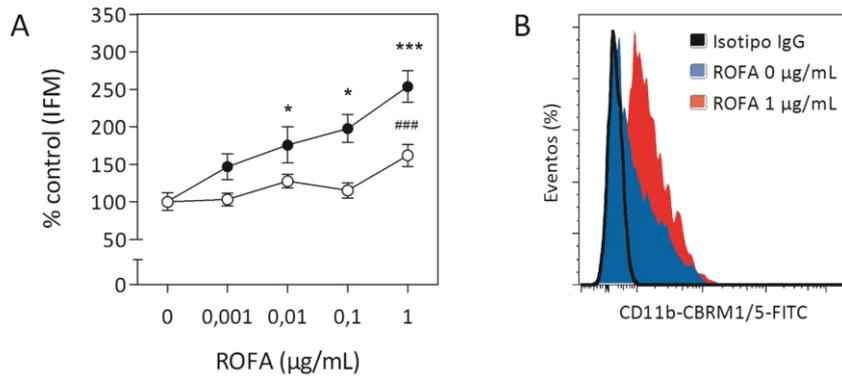


Figura 60. Efecto directo de ROFA sobre la activación de macrófagos. Las células fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA. (A) Evaluación del nivel de expresión de CD11b (○) y abundancia de su epítipo de activación CBRM1/5 (●) por citometría de flujo. (B) Superposición de histogramas de la señal correspondiente a la activación de CD11b para la incubación con ROFA (0 y 1 µg/mL) y para el control de isotipo de IgG. #### $p < 0,001$ versus CD11b en ROFA 0 µg/mL; * $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ versus CD11b activado en ROFA 0 µg/mL.

4.1.2. Liberación de citoquinas proinflamatorias

La activación de macrófagos también fue evaluada teniendo en cuenta la liberación de citoquinas en respuesta a una exposición *in vitro* a ROFA. Para ello, luego de 24 h de incubación, se determinó la concentración de TNF- α e IL-6 en el sobrenadante del medio de cultivo. Como control del ensayo se incubaron macrófagos en medio RPMI en ausencia de ROFA. Como se puede observar en la Figura 61A, el nivel de TNF- α aumentó 2,6 veces luego de la exposición a ROFA (RPMI: 12 ± 3 pg/mL), mientras que el de IL-6 (Figura 61B) lo hizo en 3,4 veces con respecto al control (RPMI: 84 ± 5 pg/mL). Estos resultados indican que la activación directa de los macrófagos por las partículas ROFA implica también la liberación de citoquinas proinflamatorias al medio extracelular.

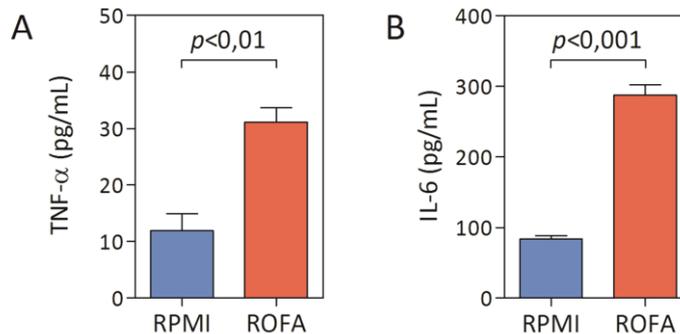


Figura 61. Efecto directo de ROFA sobre la liberación de citoquinas. Las macrófagos fueron incubadas con una suspensión de ROFA (1 µg/mL), y se evaluó el nivel de (A) TNF- α y (B) IL-6 en el sobrenadante del medio de cultivo luego de 24 h. Como control del ensayo, se incubaron macrófagos en medio RPMI en ausencia de ROFA.

4.2. Activación de células mieloides

En el punto 3.2.2 del Capítulo III se observó un aumento en el nivel de activación de CD11b en neutrófilos y monocitos circulantes en los ratones expuestos a ROFA, indicativo de la activación *in vivo* de estas subpoblaciones de leucocitos en el grupo instilado con el MP. En esta sección se propone estudiar los posibles mecanismos a través de los cuales podría ocurrir este proceso, utilizando distintos acercamientos *in vitro*.

4.2.1. Efecto directo de las partículas ROFA sobre la activación de neutrófilos y monocitos

Numerosos estudios sugieren que el MP, o al menos algunos de sus constituyentes, son capaces de atravesar el epitelio respiratorio luego de ser inhalados, llegando a circulación sistémica en cuestión de minutos (Nemmar y col., 2002; Wallenborn y col., 2007). Por esta razón, se evaluó el posible efecto directo de las partículas ROFA sobre la activación de estas células en el presente modelo. Para ello, se aislaron los leucocitos según se indica en la sección 7.9.1 de Materiales y Métodos, y se incubaron con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA en un rango de 0 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio de cultivo. Luego de 24 h, se evaluó el nivel de expresión y activación de CD11b por citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 62, no se observó efecto directo alguno de ROFA sobre neutrófilos, a ninguna de las concentraciones evaluadas.

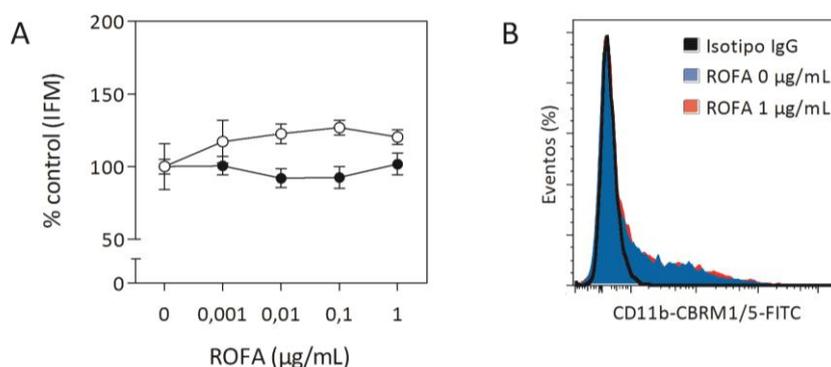


Figura 62. Efecto directo de ROFA sobre la activación de neutrófilos. Las células aisladas fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA. (A) Evaluación del nivel de expresión de CD11b (○) y abundancia de su epitope de activación CBRM1/5 (●) por citometría de flujo. (B) Superposición de histogramas de la señal correspondiente a la activación de CD11b en neutrófilos, para la incubación con ROFA (0 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y para el control de isotipo de IgG.

Por otro lado, la expresión de CD11b en monocitos se vio significativamente aumentada en un 41% cuando se los incubó con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ROFA ($p < 0,05$); mientras que el nivel de activación de CD11b aumentó en un 70% y 82% cuando se los incubó con 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ROFA, respectivamente ($p < 0,01$) (Figura 63).

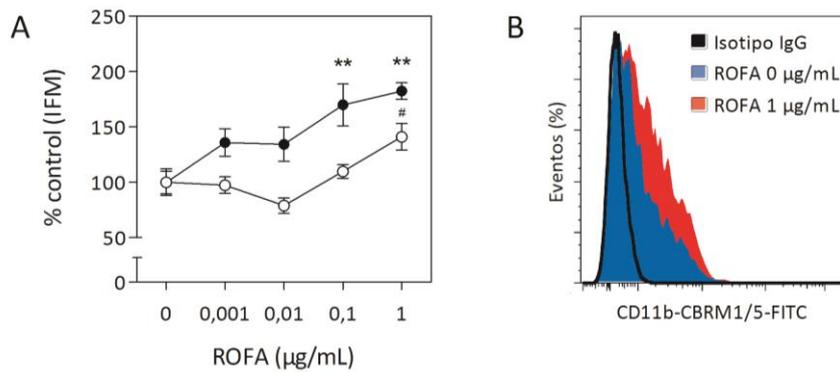


Figura 63. Efecto directo de ROFA sobre la activación de monocitos. Las células aisladas fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA. (A) Evaluación del nivel de expresión de CD11b (o) y abundancia de su epítipo de activación CBRM1/5 (●) por citometría de flujo. (B) Superposición de histogramas de la señal correspondiente a la activación de CD11b en monocitos, para la incubación con ROFA (0 y 1 µg/mL) y para el control de isotipo de IgG. # $p < 0,05$ versus CD11b en ROFA 0 µg/mL; y ** $p < 0,01$ versus CD11b activado en ROFA 0 µg/mL.

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que las partículas ROFA tienen la capacidad de inducir de forma directa la activación de monocitos *in vitro*, pero no de neutrófilos.

4.2.1.1. Efecto de la fracción soluble de ROFA, y de las partículas ROFA lavadas, sobre el nivel de activación de los monocitos

Con el objetivo de identificar algún componente de las partículas ROFA como principal responsable de la activación observada en los monocitos (Figura 63), se repitió el experimento anterior incubando monocitos aislados con concentraciones crecientes de la fracción soluble de ROFA, o de partículas ROFA lavadas, en un rango de 0 a 1 µg/mL de medio de cultivo. Como se puede observar en la Figura 64A, la fracción soluble de ROFA no produjo efecto alguno sobre la expresión de CD11b, pero indujo un aumento significativo del 36% en su nivel de activación cuando los monocitos fueron incubados con 1 µg/mL de la misma ($p < 0,01$). Por el contrario, las partículas ROFA lavadas no modificaron el nivel de activación de CD11b, pero indujeron un aumento significativo del 37% en su expresión cuando los monocitos fueron incubados con 1 µg/mL de las mismas ($p < 0,01$) (Figura 64B). En todos los casos, los aumentos observados en el nivel de expresión o activación de CD11b fueron menores que los registrados para la incubación de monocitos con la suspensión de ROFA (Figura 63). Estos resultados sugieren que ambos componentes, tanto la fracción soluble de ROFA como la partícula lavada, contribuyen en forma diferencial a la activación de los monocitos por ROFA.

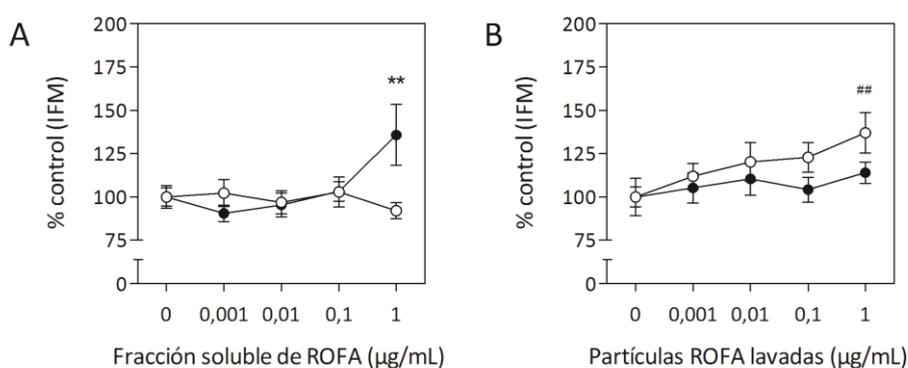


Figura 64. Efecto de los distintos componentes de las partículas ROFA sobre la activación de monocitos. Evaluación del nivel de expresión de CD11b (○) y abundancia de su epítipo de activación CBRM1/5 (●) por citometría de flujo. Las células fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de (A) la fracción soluble de ROFA y de (B) partículas ROFA lavadas. ## $p < 0,01$ versus CD11b en partículas ROFA lavadas 0 µg/mL; ** $p < 0,01$ versus CD11b activado en la fracción soluble de ROFA 0 µg/mL.

Así como se había observado para la incubación con una suspensión de ROFA (Figura 62), no se encontró efecto alguno de la fracción soluble de ROFA, o de las partículas ROFA lavadas, sobre el nivel de expresión o activación de CD11b en neutrófilos (datos no mostrados).

4.2.2. Efecto de los mediadores plasmáticos sobre la activación de neutrófilos y monocitos

En el punto 2.3.1 del Capítulo II, se mostró que la instilación con ROFA induce un aumento significativo de TNF- α e IL-6 en plasma, llegando a un máximo a las 3 h luego del tratamiento. Para evaluar si los mediadores presentes en el plasma podrían ser los responsables de la activación de las células mieloides en el presente modelo, se aislaron neutrófilos y monocitos, y se incubaron en un medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes de plasma proveniente de ratones instilados con ROFA, obtenido 3 h luego del tratamiento. Luego de 24 h, se evaluó el nivel de expresión y activación de CD11b por citometría de flujo.

Por un lado, los niveles de expresión y activación de CD11b en neutrófilos se vieron significativamente aumentados en un 52% y 108% ($p < 0,01$), respectivamente, cuando se suplementó el medio de cultivo con 1,0% V/V de plasma (Figura 65A). Por otro lado, los niveles de expresión y activación de CD11b en monocitos se vieron significativamente aumentados en un 59% ($p < 0,01$) y 26% ($p < 0,05$), respectivamente, cuando se suplementó el medio de cultivo con 0,5% V/V de plasma; y en un 58% ($p < 0,01$) y 25% ($p < 0,01$), respectivamente, cuando se suplementó el medio de cultivo con 1,0% V/V de plasma (Figura 65B). Estos resultados sugieren que los niveles de los mediadores presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA inducen la activación de neutrófilos y monocitos en el presente modelo.

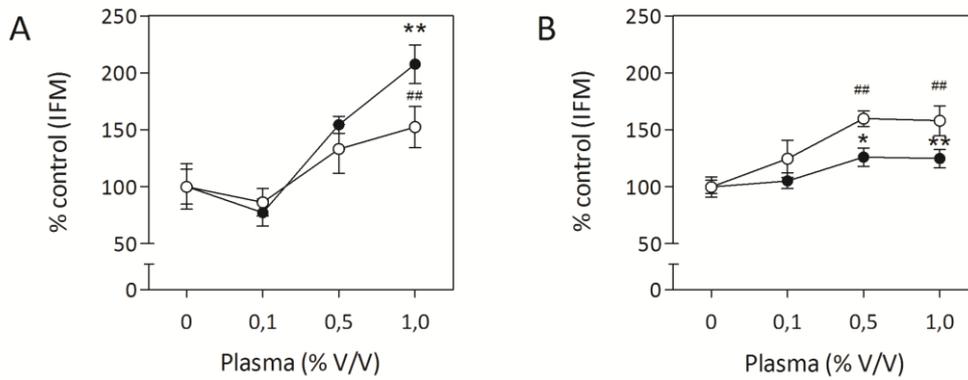


Figura 65. Efecto del plasma proveniente de ratones expuestos a ROFA sobre la activación de células de la serie mieloide. Evaluación del nivel de expresión de CD11b (o) y abundancia de su epitope de activación CBRM1/5 (●) por citometría de flujo en (A) neutrófilos y (B) monocitos. Las células fueron aisladas e incubadas 24 h con concentraciones crecientes de plasma de ratón, obtenido 3 h luego de una exposición aguda a ROFA. ## $p < 0,01$ versus CD11b en plasma 0% V/V; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus CD11b activado en plasma 0% V/V.

4.2.2.1. Bloqueo de citoquinas proinflamatorias

Para confirmar que la activación *ex vivo* de neutrófilos y monocitos observada en el punto anterior se debe a las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA, se repitió el experimento suplementando al medio de cultivo con plasma (1% V/V) incubado previamente con anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α o anti-IL-6 (10 ng/mL plasma). Como se puede observar en la Figura 66, el bloqueo de TNF- α previno la activación de CD11b en neutrófilos y monocitos inducida por la incubación con plasma proveniente de ratones instilados con ROFA. Al bloquear la IL-6, también se observó una tendencia a la disminución de dicha activación, aunque no llegó a ser estadísticamente significativa. Como control del isotipo de inmunoglobulina, las muestras de plasma fueron incubadas alternativamente con IgG₁. Estos resultados indican que el TNF- α presente en el plasma de los ratones expuestos a ROFA es el principal mediador de la activación de neutrófilos y monocitos en el presente modelo.

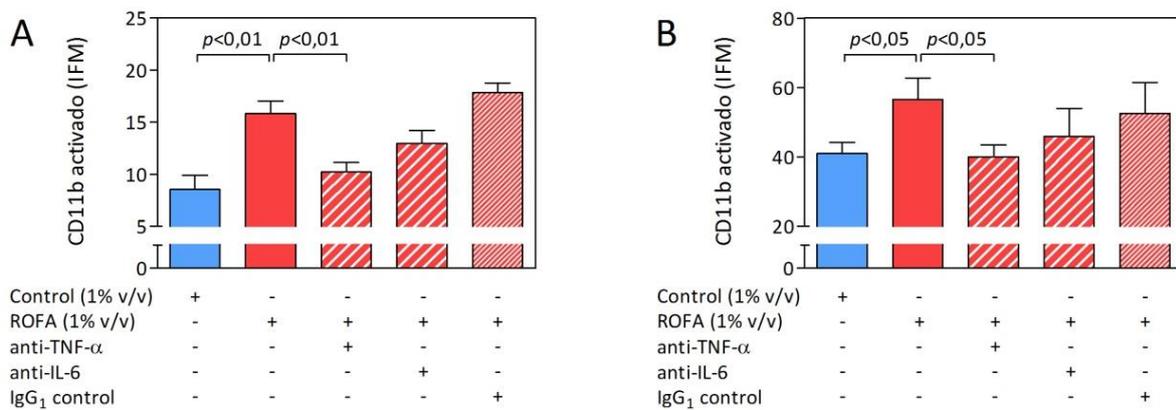


Figura 66. Efecto del bloqueo de las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de ratones expuestos a ROFA sobre el nivel de activación de células de la serie mieloide. Evaluación de la abundancia del epitope de activación de CD11b (CBRM1/5) por citometría de flujo en (A) neutrófilos y (B) monocitos. Las células fueron aisladas e incubadas 24 h con plasma (1% V/V) obtenido 3 h luego de una exposición aguda a solución salina o una suspensión de ROFA, e incubado previamente con los anticuerpos bloqueantes o el control de isotipo de IgG indicados.

4.3. Activación de células endoteliales

En el punto 3.2.2 del Capítulo III se observó un aumento en los niveles sICAM-1 y sVCAM-1 en el plasma de los ratones expuestos a ROFA, indicativo de la activación *in vivo* del endotelio. Siguiendo el razonamiento utilizado para evaluar la activación de células mieloides, se estudió el efecto de ROFA y de las citoquinas proinflamatorias sobre la activación de células endoteliales en cultivo.

4.3.1. Efecto directo de las partículas ROFA sobre la activación de células endoteliales

Para evaluar el efecto directo de ROFA sobre la activación del endotelio, se utilizó un cultivo primario obtenido como se indica en la sección 7.9.2 de Materiales y Métodos. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA en un rango de 0 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio de cultivo, de forma análoga al protocolo realizado en monocitos y neutrófilos. Luego de 24 h, se evaluó la expresión de distintas integrinas (ICAM-1 y VCAM-1) y selectinas (P-Selectina y E-Selectina) por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 67, no se observaron cambios en los niveles de expresión de las distintas moléculas de adhesión endoteliales analizadas. Como control positivo del ensayo, el medio de cultivo fue suplementado con 10 ng/mL de TNF- α . Estos resultados sugieren que las partículas ROFA no poseen la capacidad de activar al endotelio de forma directa.

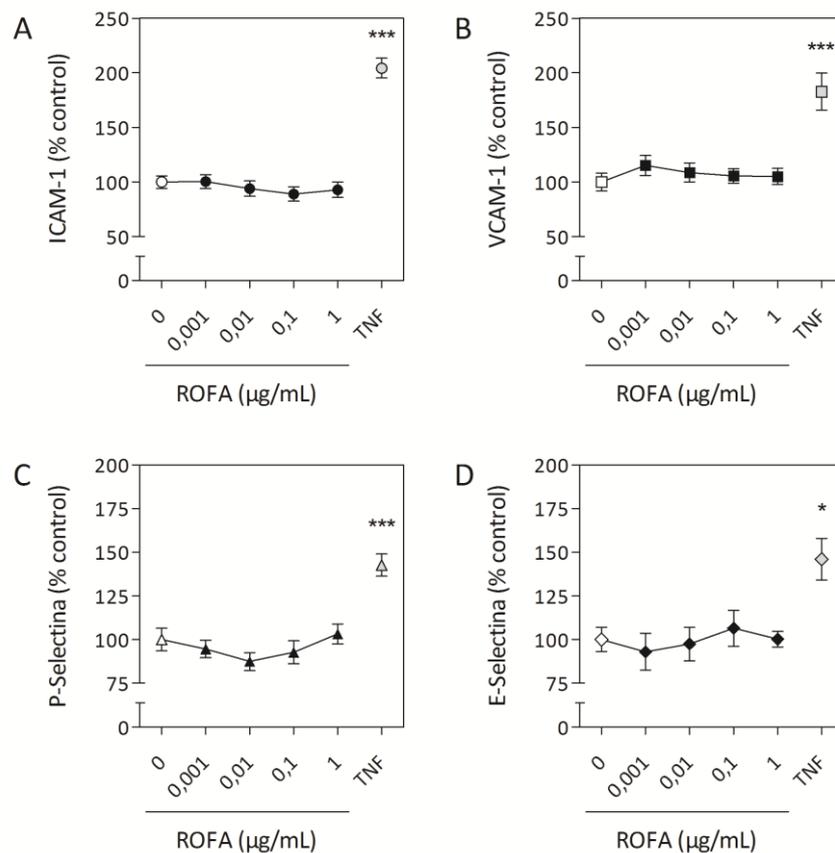


Figura 67. Efecto directo de las partículas ROFA sobre la activación del endotelio. Evaluación de los niveles de expresión de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas: (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1; y de las selectinas: (C) P-Selectina y (D) E-Selectina por citometría de flujo. Las células endoteliales en cultivo fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de una suspensión de ROFA. TNF- α (10 ng/mL) fue utilizado como control positivo del ensayo. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus ROFA 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Asimismo, no se observó efecto alguno de la fracción soluble de ROFA, o de las partículas ROFA lavadas, sobre el nivel de expresión de integrinas o selectinas endoteliales (datos no mostrados).

4.3.2. Efecto de los mediadores plasmáticos sobre la activación de células endoteliales

Se utilizó un cultivo primario de células endoteliales, obtenido según se indica en la sección 7.9.2 de Materiales y Métodos. El medio de cultivo fue suplementado con concentraciones crecientes de plasma proveniente de ratones instilados con ROFA, obtenido 3 h luego del tratamiento, de forma análoga al protocolo realizado en monocitos y neutrófilos. Luego de 24 h de incubación, se evaluó el nivel de expresión de ICAM-1, VCAM-1, P-Selectina y E-Selectina por citometría de flujo. Se observó un aumento progresivo en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 al incrementar la concentración de plasma en el medio de cultivo (Figuras 68A y 68B). En cuanto a las selectinas, no se observaron cambios en sus niveles de expresión en las distintas condiciones evaluadas (Figuras 68C y 68D). Estos resultados sugieren que los mediadores presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA inducen la expresión de integrinas, pero no de selectinas, en células endoteliales.

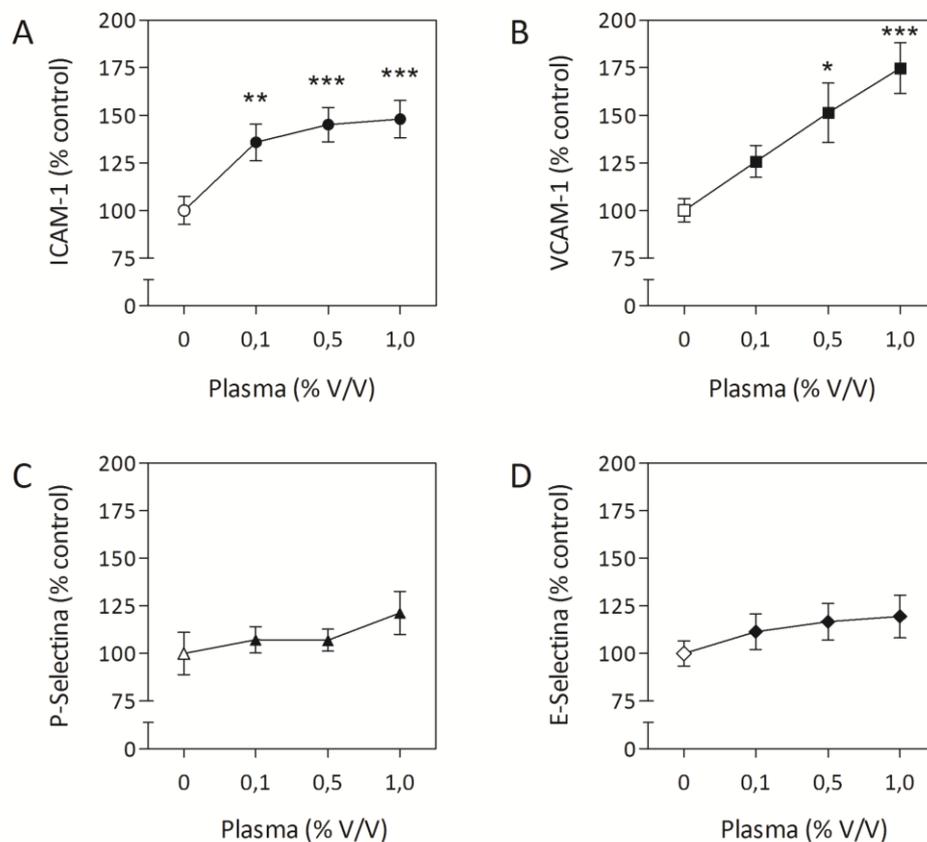


Figura 68. Efecto del plasma proveniente de ratones expuestos a ROFA sobre la activación del endotelio. Evaluación de los niveles de expresión de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas: (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1; y de las selectinas: (C) P-Selectina y (D) E-Selectina por citometría de flujo. Las células endoteliales en cultivo fueron incubadas 24 h con concentraciones crecientes de plasma, obtenido 3 h luego de una exposición aguda a ROFA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ versus plasma 0 % V/V.

4.3.2.1. Bloqueo de las citoquinas proinflamatorias

Para confirmar que la activación *ex vivo* de las células endoteliales observada se debe a las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA, se repitió el experimento mostrado en la sección anterior, utilizando plasma (1% V/V) incubado previamente con anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α o anti-IL-6 (10 ng/mL plasma). Como se puede observar en la Figura 69, el bloqueo de TNF- α previno los aumentos en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales inducida por la incubación con plasma proveniente de ratones instilados con ROFA. Al bloquear la IL-6, también se observó una disminución significativa de la expresión de ICAM-1. Como control del isotipo de inmunoglobulina, las muestras de plasma fueron incubadas alternativamente con IgG₁.

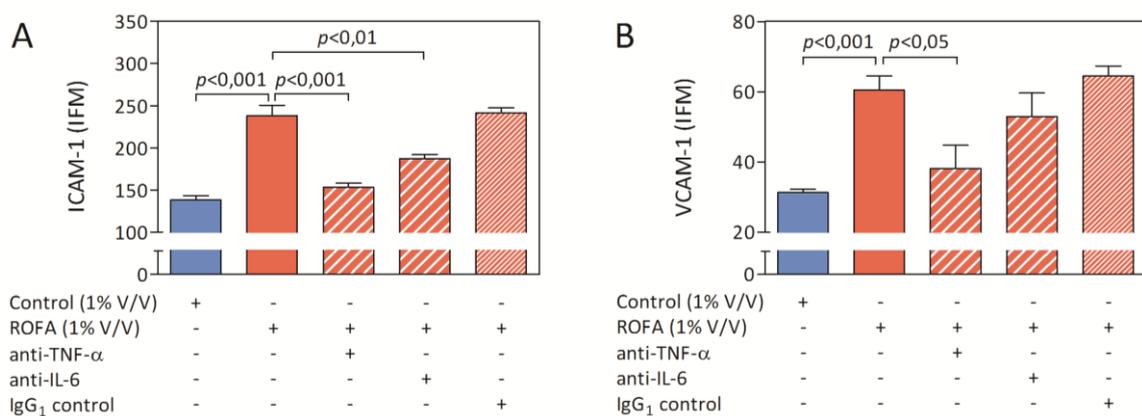


Figura 69. Efecto del bloqueo de las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de ratones expuestos a ROFA sobre el nivel de activación del endotelio. Evaluación de los niveles de expresión de las integrinas (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 por citometría de flujo. Las células endoteliales en cultivo fueron incubadas 24 h con plasma (1% V/V) obtenido 3 h luego de una exposición aguda a ROFA, e incubado previamente con los anticuerpos bloqueantes o el control de isotipo de IgG indicados.

Estos resultados indican que el TNF- α y, en menor medida, la IL-6 presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA son los principales responsables de la activación del endotelio en el presente modelo.

Sinopsis

Las alteraciones más significativas en el metabolismo oxidativo y energético cardíaco, así como en la función contráctil, se observaron trascurridas 3 h luego de la exposición a ROFA. Este momento coincide con el máximo incremento de los marcadores de respuesta inflamatoria sistémica (TNF- α e IL-6) en este grupo.

Por otro lado, experimentos in vitro mostraron que el bloque selectivo de las distintas citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA (principalmente al TNF- α) disminuye la activación de células endoteliales y de la serie mieloide.

De esta manera, en este último capítulo se propone estudiar la inhibición de la respuesta inflamatoria sistémica in vivo mediada por TNF- α , mediante la administración previa de un anticuerpo bloqueante anti-TNF- α (Infliximab), evaluando la potencial prevención de los efectos cardíacos adversos inducidos por ROFA.

5.1. Efecto del Infliximab sobre la respuesta inflamatoria sistémica inducida por la exposición a ROFA

5.1.1. Perfil de citoquinas en plasma

Con el objetivo de evaluar el efecto producido por el tratamiento previo con Infliximab sobre la respuesta inflamatoria sistémica en los ratones expuestos a ROFA, se evaluaron los niveles de TNF- α e IL-6 en plasma. Como se había mostrado en la sección 2.3.1 del Capítulo II, la administración de ROFA indujo aumentos significativos en los niveles plasmáticos de ambas citoquinas proinflamatorias, con un máximo a las 3 h luego del tratamiento (Figura 45A y 45B). Como se observa en la Figura 70, el tratamiento previo con Infliximab previno estos aumentos en los ratones instilados con ROFA, dado que no se observaron diferencias significativas en los valores correspondientes a este grupo con respecto al control. En lo que refiere al TNF- α , el nivel plasmático de esta citoquina en los ratones expuestos a ROFA y tratados previamente con Infliximab se asemejó al grupo control (control + Infliximab: 60 ± 20 pg/mL) (Figura 70A). En cuanto a la IL-6, el tratamiento previo con Infliximab también atenuó el aumento en los niveles plasmáticos de esta citoquina inducido por la exposición a ROFA. Sin embargo, este efecto parecería no ser total, dado que los niveles plasmáticos de IL-6 en los ratones expuestos a ROFA y pretratados con Infliximab fueron sensiblemente mayores con respecto al grupo control (control + Infliximab: 80 ± 30 pg/mL), a pesar de no haberse observado diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 70B). El tratamiento previo con el anticuerpo no modificó significativamente los niveles plasmáticos de estas citoquinas en ratones control. Estos resultados indican que la administración previa de Infliximab previene los aumentos en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias inducidos por una exposición aguda a ROFA.

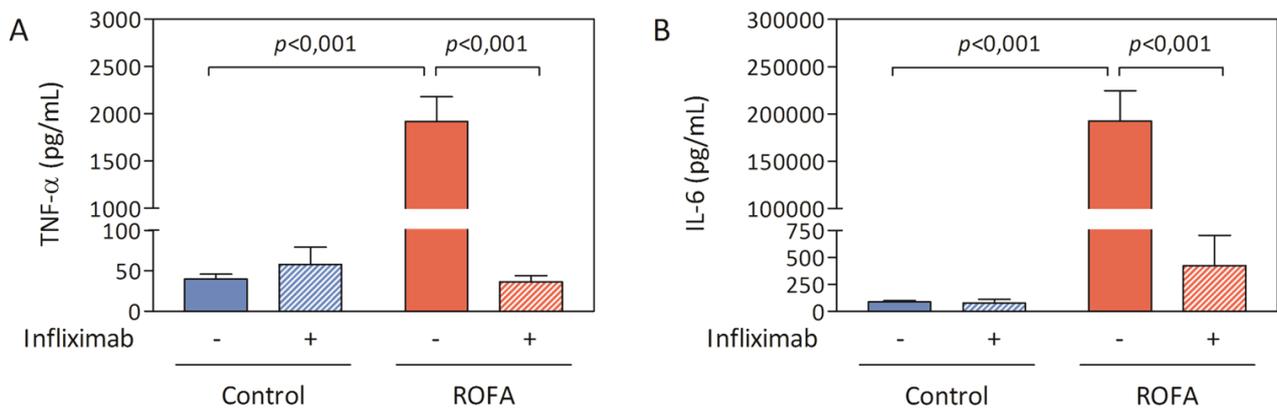


Figura 70. (A) Determinación de los niveles plasmáticos de TNF- α y (B) IL-6 en ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab. Las muestras de sangre fueron obtenidas 3 h luego de la exposición aguda al MP.

5.2. Efecto del Infliximab sobre los cambios en el metabolismo oxidativo cardíaco inducidos por la exposición a ROFA

5.2.1. Consumo de O_2 en cortes de tejido

Como se había mostrado en la sección 1.1.1 del Capítulo I, la instilación intranasal de ROFA produjo una disminución significativa del 35% en el consumo de O_2 cardíaco (control 3 h: 1200 ± 70 ng-at O/min g tejido, $p < 0,01$), transcurridas 3 h luego de la exposición (Figura 32). Como se observa en el trazo representativo de la Figura 71, el tratamiento previo con Infliximab previno esta disminución en los ratones instilados con ROFA.

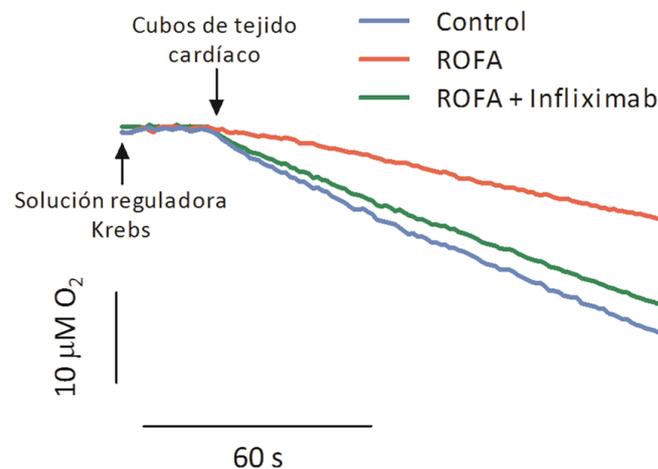


Figura 71. Trazo representativo obtenido durante la evaluación del consumo de O_2 cardíaco, en muestras provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab. Las muestras fueron obtenidas 3 h luego de la exposición aguda al MP.

En la Figura 72 se puede observar que el tratamiento previo con Infliximab no modificó el consumo de O_2 en ratones control, pero indujo una recuperación de la disminución del consumo de O_2 en los ratones expuestos a ROFA (ROFA - Infliximab: 750 ± 60 ng-at O/min g tejido, $p < 0,05$). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los valores correspondientes a este grupo con respecto al

control, se observó una tendencia a la disminución del 14% en el consumo de O₂ cardíaco entre ambos grupos. Estos resultados indican que al inhibir la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF- α , se previene la disminución del consumo de O₂ en corazón inducida por una exposición aguda a ROFA.

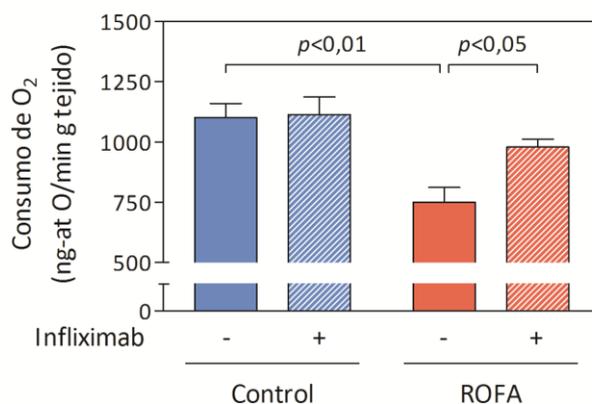


Figura 72. Consumo de O₂ cardíaco en cortes de tejido de 1 mm³, provenientes de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infiximab. Las muestras de corazón fueron obtenidas 3 h luego de la exposición aguda al MP.

5.3. Efecto del Infiximab sobre las alteraciones de la función cardíaca inducidas por la exposición a ROFA

En el Capítulo I se mostró como la instilación intranasal de ROFA indujo una disminución de la reserva contráctil y diastólica cardíaca (Figura 38B y 39B), como consecuencia de alteraciones metabólicas a nivel tisular y mitocondrial. En este contexto, se evaluó si el tratamiento previo con Infiximab es capaz de revertir estas alteraciones inducidas por la exposición al MP.

5.3.1. Reserva contráctil cardíaca

Como se observa en la Tabla 6, la instilación intranasal de ROFA atenuó el incremento de la PDVI en respuesta al estímulo β -adrenérgico con ISO, mientras que la administración previa de Infiximab revirtió este efecto observándose una respuesta similar al control.

Tabla 6: Evaluación de la reserva contráctil cardíaca por la técnica de Langendorff. Las mediciones se realizaron luego de una exposición aguda al MP, en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO. Determinación de la PDVI en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infiximab.

Tratamiento	Infiximab	PDVI (mmHg)	
		Basal	ISO
CONTROL	-	77 \pm 5	114 \pm 8***
	+	79 \pm 6	121 \pm 9***
ROFA	-	86 \pm 9	102 \pm 11
	+	95 \pm 5	129 \pm 7***

*** p <0,001 versus Basal

Al expresar los resultados de la Tabla 6 como la Δ PDVI en condiciones basales y luego del estímulo con ISO, se observó una diferencia del 52% en los animales control. En los ratones instilados con ROFA la Δ PDVI fue significativamente menor, de un 18% con respecto a condiciones basales. En los ratones instilados con ROFA y tratados previamente con Infliximab, la Δ PDVI ascendió nuevamente a un 35% (Figura 73). El tratamiento con el anticuerpo no produjo alteraciones significativas de la reserva contráctil cardíaca en los ratones control. Estos resultados indican que al inhibir la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF- α , se previene la disminución de la reserva contráctil cardíaca inducida por una exposición aguda a ROFA.

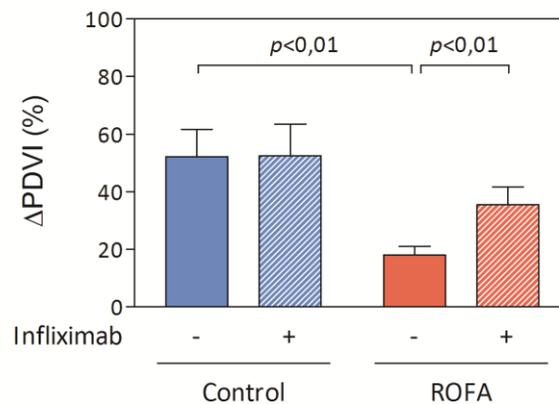


Figura 73. Evaluación de la reserva contráctil cardíaca por la técnica de Langendorff. Incremento de la PDVI (Δ PDVI), expresado como la diferencia porcentual entre la PDVI en condiciones basales y luego del estímulo β -adrenérgico, en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab. Las muestras fueron obtenidas 3 h luego de la exposición aguda al MP.

5.3.2. Reserva diastólica cardíaca

Como se observa en la Tabla 7, la instilación intranasal de ROFA atenuó el descenso del t_{50} en respuesta al estímulo β -adrenérgico con ISO, mientras que la administración previa de Infliximab mostró una tendencia a revertir este efecto, aunque no llegó a ser estadísticamente significativa con respecto a las condiciones basales.

Tabla 7: Evaluación de la reserva diastólica cardíaca por la técnica de Langendorff. Las mediciones se realizaron luego de una exposición aguda al MP, en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico inducido por ISO. Determinación del t_{50} en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab.

Tratamiento	Infliximab	t_{50} (s)	
		Basal	ISO
CONTROL	-	14,3 \pm 0,5	9,9 \pm 0,9**
	+	15,5 \pm 0,8	10,9 \pm 1,1**
ROFA	-	15,1 \pm 3,3	14,3 \pm 2,6
	+	16,2 \pm 5,5	11,2 \pm 3,1

** $p < 0,01$ versus Basal

Al expresar los resultados de la Tabla 7 como la Δt_{50} en condiciones basales y luego del estímulo con ISO, se observó una diferencia del -31% en los animales control. En los ratones instilados con ROFA la Δt_{50} fue significativamente menor, de un -3% con respecto a condiciones basales. En ratones instilados con ROFA y tratados previamente con Infliximab, la Δt_{50} fue de un -21% (Figura 74). El tratamiento previo con el anticuerpo no produjo alteraciones significativas de la reserva diastólica cardíaca en ratones control. Estos resultados indican que al inhibir la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF- α se previene, además, la disminución de la reserva diastólica cardíaca inducida por una exposición aguda a ROFA.

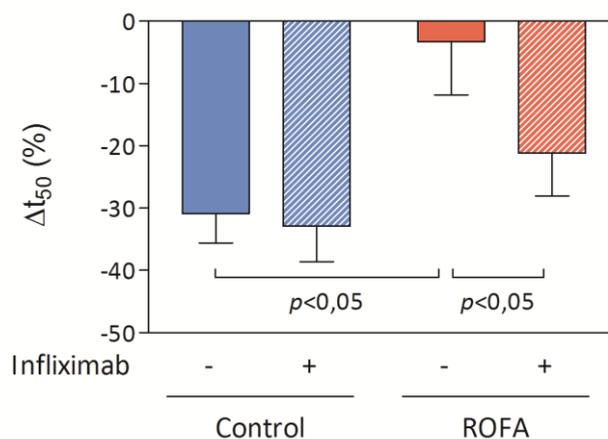


Figura 74. Evaluación de la reserva diastólica cardíaca por la técnica de Langendorff. Incremento del t_{50} (Δt_{50}), expresado como la diferencia porcentual entre el t_{50} en condiciones basales y luego del estímulo β -adrenérgico, en corazones de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab. Las muestras fueron obtenidas 3 h luego de la exposición aguda al MP.

5.3.3. Consumo de O_2 cardíaco luego del estímulo β -adrenérgico

En la sección 1.2.3 del Capítulo I se mostró como la instilación intranasal de ROFA atenuó el incremento del consumo de O_2 cardíaco inducido por el estímulo β -adrenérgico con ISO observado en animales control (Figura 40). Como se muestra en la Tabla 8, el tratamiento previo con Infliximab previno este efecto en los ratones expuestos a ROFA. En ratones control, se observó un incremento del 44% en el consumo de O_2 en respuesta al estímulo con ISO ($p < 0,001$). En ratones instilados con ROFA, esta diferencia fue significativamente menor, de un 33% con respecto a condiciones basales ($p < 0,05$). En ratones instilados con ROFA y tratados previamente con Infliximab, se observó un incremento significativo del 37 % en el consumo de O_2 cardíaco en respuesta al estímulo β -adrenérgico ($p < 0,01$).

Tabla 8: Consumo de O₂ cardíaco en cortes de tejido, en condiciones basales y luego de un estímulo β-adrenérgico inducido por ISO. Se utilizaron muestras de corazón de ratones expuestos a solución salina o a una suspensión de ROFA, y luego de un tratamiento previo con Infliximab. Las mediciones se realizaron 3 h luego de una exposición aguda al MP, y posteriormente a la evaluación de la reserva contráctil cardíaca.

Tratamiento	Infliximab	Consumo de O ₂ (ng-at O/min g tejido)	
		Basal	ISO
CONTROL	-	1180 ± 70	1700 ± 100***
	+	1170 ± 70	1730 ± 90***
ROFA	-	770 ± 60	1020 ± 70*####
	+	1030 ± 40	1410 ± 80**.*§

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ versus Basal

$p < 0,001$ versus Control ISO - Infliximab

§ $p < 0,05$ versus Control ISO - Infliximab

Por otro lado, el consumo de O₂ cardíaco luego del estímulo β-adrenérgico fue un 60% menor en los ratones expuestos a ROFA con respecto a la misma situación correspondiente al grupo control ($p < 0,001$). Para el caso del grupo instilado con ROFA y pretratado con Infliximab, esta diferencia fue de un 21% en comparación con la misma situación para el grupo control ($p < 0,05$). El tratamiento previo con el anticuerpo no produjo alteraciones significativas del consumo de O₂ cardíaco en respuesta al estímulo β-adrenérgico en ratones control. Estos resultados indican que al inhibir la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF-α, se previenen las alteraciones del consumo de O₂ cardíaco en respuesta al estímulo β-adrenérgico con ISO inducidos por la exposición aguda a ROFA.

5.4. **Correlación entre el consumo de O₂ y la contractilidad cardíaca en ratones expuestos a ROFA y tratados previamente con Infliximab**

Como se había mostrado en la sección 1.3 del Capítulo I, en condiciones normales, se observó una relación directa entre los cambios en el consumo de O₂ y la contractilidad cardíaca (Figura 41A). En esa misma sección se mostró como la exposición a ROFA tuvo como consecuencia la pérdida de esta correlación (Figura 41B). En la Figura 75 se muestra como el tratamiento previo con Infliximab revirtió el efecto producido por la exposición a ROFA, ya que los animales tratados previamente con el anticuerpo mostraron una correlación positiva similar a la del grupo control ($r^2 = 0,7075$; $p < 0,001$).

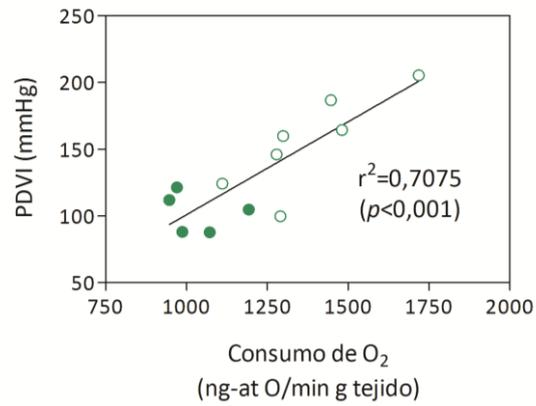


Figura 75. Correlación entre el consumo de O₂ cardíaco y la PDVI en corazones de ratones tratados previamente con Infliximab y expuestos a una suspensión de ROFA, en condiciones basales (●) y luego de un estímulo β-adrenérgico (○).

Este hallazgo indica que al inhibir la respuesta inflamatoria sistémica mediada por TNF-α se previene la pérdida de la capacidad de respuesta del corazón frente a cambios en el trabajo cardíaco, como se había observado en los ratones expuestos a ROFA.

1. ASPECTOS GENERALES

Numerosos estudios epidemiológicos muestran que los descensos en la calidad del aire respirado se encuentran asociados a incrementos en las tasas de morbilidad y mortalidad por diversas afecciones cardiopulmonares (Brook y col., 2010). En su último informe, la OMS estima que unas 7 millones de personas por año mueren prematuramente a causa de los efectos perjudiciales de la contaminación ambiental. Entre las causas de muerte más frecuentes, predominan las cardiovasculares (como el IAM y el ACV) por sobre las respiratorias (como la EPOC, el cáncer y las infecciones respiratorias bajas) (OMS, 2014). A pesar de la naturaleza compleja de la contaminación ambiental y de la coexistencia de numerosos compuestos con potenciales efectos perjudiciales sobre la salud, evidencia epidemiológica sustancial indica que el principal responsable es el MP, especialmente aquél cuyo origen es antropogénico.

Se ha reportado que la asociación entre la inhalación de MP y los efectos adversos sobre la salud se debe tanto a exposiciones crónicas como agudas. De hecho, se desconoce con exactitud si los efectos nocivos encontrados en estudios a largo plazo no son, en realidad, una consecuencia de las exposiciones agudas a altos niveles de MP durante un período considerado (Polichetti y col., 2009). En este sentido, se ha observado que las exposiciones de tan sólo unas pocas horas son suficientes como para incrementar significativamente el riesgo de sufrir un IAM (Peters y col., 2001). Diversos estudios muestran que la inhalación de MP induce la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación, primero local y luego sistémica, y que ésta situación puede repercutir negativamente sobre el sistema cardiovascular e inducir los efectos adversos reportados (Miller, 2014). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos subyacentes a estas observaciones, ni de su participación en las implicancias de la exposición al MP sobre el sistema cardiovascular.

2. MODELO EXPERIMENTAL DE EXPOSICIÓN AL MP

En el marco del presente trabajo de tesis se ha elegido la instilación intranasal como vía de administración del MP. Esta técnica es ampliamente utilizada en estudios toxicológicos, con el objetivo de evaluar los efectos adversos de la exposición a diversos contaminantes ambientales como el MP. La principal ventaja de esta vía de administración radica en que se trata de un procedimiento no invasivo y de simpleza relativa, en comparación con otras técnicas disponibles más sofisticadas que requieren de equipamiento específicamente diseñado para tal fin, como la vía inhalatoria en cámaras de exposición. Por otro lado, la instilación intranasal permite un mejor manejo de la dosis administrada y una conservación adecuada de la muestra de MP ensayado. La principal limitación de esta técnica radica en que se trata de una forma de exposición no fisiológica, dado que se expone al animal al total de la dosis en una única administración de los contaminantes en suspensión, mediante un bolo a través de las fosas nasales (Driscoll y col., 2000). Sin embargo, se ha mostrado que el MP administrado tanto por instilación como por inhalación, en dosis equivalentes, se dispersa de forma similar en el tracto respiratorio y los

lóbulos pulmonares, de forma tal que induce niveles de inflamación y daño tisular prácticamente idénticos (Costa y col., 2006). Por estas razones, la instilación intranasal es la vía de elección para estudios de los mecanismos toxicológicos inducidos por contaminantes ambientales, especialmente en modelos agudos. En un trabajo que describe las características de este tipo de administración en ratones, se ha estudiado el patrón de distribución de la dosis mediante el uso de la técnica de la gota nasal y de MP marcado radioactivamente. Se ha observado que las variables fundamentales de esta vía de administración son el volumen utilizado y el nivel de anestesia del animal. El volumen óptimo encontrado fue de 50 μL , como el utilizado en el presente trabajo, mostrando una deposición promedio del 75% del MP administrado en las vías aéreas inferiores luego de 1 h, sin presencia significativa de la marca radioactiva en esófago o estómago. En cuanto a la anestesia, se observó que es determinante el uso de una sedación leve del animal para una adecuada penetración de la dosis instilada, independientemente del tipo de anestésico utilizado (inhalatorio o inyectable) (Southam y col., 2002).

Se han utilizado diversos modelos de MP en animales de experimentación para el estudio de los efectos biológicos producidos por su inhalación. Debido a su relevancia como contaminante ambiental y composición química característica, las partículas ROFA han sido especialmente útiles en el estudio de la toxicidad del MP mediada por los metales de transición (Chen y Lippmann, 2009). La caracterización de la muestra utilizada en el presente trabajo de tesis (Figura 15) es congruente con este concepto.

Se ha reportado que la inhalación de ROFA induce estrés oxidativo e inflamación local, tanto en humanos (Hauser y col., 1995; Ghio y col., 2001) como en modelos animales (Ghio y col., 2002b; Gurgueira y col., 2002; Magnani y col., 2011). Estudios *in vitro* sugieren que, al ser incubado con células del epitelio respiratorio, otros tipos de MP siguen un mecanismo de acción similar a ROFA, caracterizado por la activación de cascadas de señalización intracelulares, fosforilación de tirosinas, activación de factores de transcripción e inducción de la expresión de mediadores inflamatorios (Ghio y col., 2002a). Se han estudiado también algunas consecuencias de la exposición a ROFA sobre el sistema cardiovascular, aunque estos trabajos se circunscriben casi exclusivamente a la evaluación de la ocurrencia de estrés oxidativo cardíaco (Gurgueira y col., 2002; Rhoden y col., 2005; Damiani y col., 2012) y a la evaluación de los efectos arritmogénicos de ROFA, o de sus metales de transición asociados (Watkinson y col., 1998; Kodavanti y col., 2000; Campen y col., 2001; Wellenius y col., 2002; Farraj y col., 2011).

En los que respecta a la dosis de ROFA administrada, la misma se encuentra dentro del rango utilizado en modelos agudos de exposición en ratas y ratones, donde se evalúan los efectos locales (Ghio y col., 2002b; Martin y col., 2010; Magnani y col., 2011 y 2013) y sistémicos de la inhalación de MP (Nurkiewicz y col., 2004 y 2006).

Cuando esta dosis se compara con los niveles de MP a los que se encuentran expuestos los seres humanos, deben realizarse ciertas consideraciones. Una persona activa presenta una ventilación promedio de 15 dm^3/min e inspira aproximadamente 20 m^3 de aire en 24 h. Si se considera una

concentración media de MP de $\approx 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, como las registradas durante las inversiones de temperatura en el valle de Utah, una persona podría inhalar alrededor de 2 mg de MP por día (Ghio y Devlin, 2001). En microambientes especialmente contaminados, como durante las exposiciones ocupacionales o las horas pico en los grandes centros urbanos ($200\text{-}500 \mu\text{g}/\text{m}^3$), la inhalación de MP en humanos puede ascender hasta 10 mg por día (Brook, 2008). La dosis de ROFA utilizada en este trabajo de tesis fue de 1 mg/kg de peso corporal (aproximadamente 25 μg de ROFA por ratón). Al normalizar por el área del pulmón correspondiente a la zona donde se produce el intercambio gaseoso, y considerando la relación existente entre dicha superficie con el peso corporal en mamíferos, esta dosis equivale a ≈ 50 mg de MP en un ser humano (Stone y col., 1992). De esta manera, la masa de MP depositada en el pulmón del ratón en el modelo utilizado equivale a la cantidad de MP que podría acumularse en un humano producto de una exposición a un ambiente contaminado ($\approx 500 \mu\text{g}/\text{m}^3$) al cabo de una semana. Cabe señalar que la fracción de deposición del MP en el tracto respiratorio depende del tamaño de la partícula y de los patrones de respiración (Schlesinger, 1985), los cuales fueron considerados constantes para el cálculo anterior. Sin embargo, podrían existir algunas diferencias en la ventilación promedio entre ratones y humanos (según se encuentren en estados de reposo, actividad o ejercicio), lo que llevaría a variaciones en la cantidad de MP depositado.

3. METABOLISMO OXIDATIVO Y ENERGÉTICO CARDÍACO: FUNCIÓN MITOCONDRIAL E IMPLICANCIAS SOBRE LA CONTRACTILIDAD Y RELAJACIÓN CARDÍACA

Se ha mostrado previamente que la exposición al MP induce la ocurrencia de estrés oxidativo en pulmón y corazón (Gurgueira y col., 2002), y que el desequilibrio del metabolismo oxidativo en el sistema respiratorio se correlaciona positivamente con una alteración de la función mitocondrial (Xia y col., 2007; Magnani y col., 2011) y con la activación de las NOX (Magnani y col., 2013). Sin embargo, poco se sabe acerca de este escenario a nivel cardíaco, así como del impacto potencial del mismo sobre la función mitocondrial y contráctil.

Como primera aproximación al estudio del metabolismo del O_2 en corazón luego de una exposición aguda ROFA, se evaluó el consumo de O_2 tisular. La utilización del O_2 por el tejido se correlaciona positivamente con la tasa metabólica del mismo, a pesar de variaciones en los requerimientos energéticos del corazón en distintas condiciones fisiológicas y patológicas (Hochachka, 1999). Los trazos lineales registrados (Figura 31) representan mayoritariamente la utilización del O_2 por la población mitocondrial oscilando entre los estados de respiración pasiva y activa, siendo la proporción estimada de ambos estados del 68% y 32%, respectivamente (Boveris y Boveris, 2007). En el modelo analizado, el consumo de O_2 cardíaco se redujo significativamente en un 23% transcurrida 1 h luego de la instilación de ROFA, llegando a un mínimo a las 3 h luego del tratamiento (Figura 32). Esto sugeriría una utilización deficiente del O_2 y depresión del metabolismo cardíaco producto de la exposición al MP. La disminución observada podría describirse como reversible, dado que los valores de consumo de O_2 en

los ratones expuestos a ROFA retornaron a los niveles del grupo control transcurridas 5 h luego del tratamiento (Figura 32). El NO es un reconocido regulador del consumo de O₂, principalmente a través de la inhibición de la respiración mitocondrial (Boveris y col., 2009). Dado que se ha observado que la exposición a MP induce aumentos en la expresión de iNOS y producción de NO en corazón de rata (Li y col., 2015), niveles aumentados de NO podrían explicar, al menos en parte, esta disminución del metabolismo oxidativo cardíaco en los ratones expuestos al MP.

Los resultados obtenidos previamente por nuestro laboratorio en el mismo modelo experimental muestran un incremento del metabolismo del O₂ pulmonar, cuyo efecto máximo se observa transcurrida 1 h luego de la exposición aguda a ROFA (Magnani y col., 2011). En contraste, las alteraciones más significativas en el corazón se dan a las 3 h luego del tratamiento. Esta diferencia en el tiempo de inducción de la aparición de los efectos a nivel cardíaco, en comparación con el tiempo necesario para la observación de los mismos a nivel pulmonar, sugiere que las alteraciones encontradas en corazón son secundarias a las provocadas por la inhalación del MP en el pulmón. Consistentemente con estos hallazgos, un desfase similar ha sido descrito para el aumento de las concentraciones en estado estacionario de especies activas del O₂ en pulmón y corazón en ratones expuestos a MP (Gurgueira y col., 2002). La liberación de mediadores prooxidantes y/o proinflamatorios desde el pulmón hacia circulación sistémica luego de la inhalación del MP podría contribuir a los efectos cardiovasculares observados. Cabe destacar que un efecto directo de ROFA, o de alguno de sus componentes solubles, no puede ser completamente descartado, así como tampoco puede dejarse de lado el efecto sobre el corazón de un posible desequilibrio en el SNA inducido por la exposición al MP. Por otro lado, las vías mencionadas no son mutuamente excluyentes y pueden solaparse temporalmente o ser activadas a distintos tiempos, lo que contribuiría de forma diferencial a los efectos adversos observados sobre el sistema cardiovascular provocados por la inhalación de MP (Brook, 2008).

Diversos trabajos han reportado que la exposición al MP induce la ocurrencia de estrés oxidativo en pulmón y corazón (Gurgueira y col., 2002; Rhoden y col., 2005). Se ha sugerido, incluso, que el tejido cardíaco podría ser más susceptible que el pulmonar al daño oxidativo provocado por la inhalación del MP (Damiani y col., 2012). Estudios previos en el modelo utilizado en el presente trabajo de tesis muestran que una exposición aguda a ROFA provoca, en el pulmón, aumentos en los marcadores de daño oxidativo a macromoléculas junto con disminuciones en los niveles de las defensas antioxidantes (Magnani y col., 2011). Esta situación es compatible con la ocurrencia de estrés oxidativo local luego de la exposición a ROFA. Sin embargo, a nivel cardíaco, no se observaron cambios en los niveles de estos marcadores. Esta situación podría deberse a la utilización de dosis relativas más bajas y tiempos más cortos que en los reportes enunciados, y sugiere que la disminución del consumo de O₂ cardíaco no se encuentra asociada a la ocurrencia de estrés oxidativo en el presente modelo. Por esta razón, el análisis de la alteración observada en el metabolismo del O₂ en corazón se enfocó hacia la bioenergética tisular, con especial énfasis en la función mitocondrial.

En condiciones fisiológicas, el 85-90% del O_2 consumido por el tejido es utilizado por la mitocondria para la producción de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa (Boveris y Boveris, 2007). Los resultados presentados en la Tabla 1 indican que una alteración de la función de esta organela explicaría la disminución del consumo de O_2 cardíaco observado en los ratones expuestos a ROFA. Esta situación estaría caracterizada por una inhibición en la cadena de transporte de electrones, con mantenimiento de la integridad de la membrana interna mitocondrial. Esto se pudo corroborar *in vitro*, mediante la determinación de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria, al encontrarse que la correspondiente al Complejo II se redujo significativamente en un 25% en ratones expuestos a ROFA en comparación con el grupo control (Tabla 2). En este contexto, no se debe descartar el efecto inhibitorio del NO sobre la cadena respiratoria. En particular, se ha reportado que la inhibición de la citocromo oxidasa (Complejo IV) por el NO es reversible y competitiva por el O_2 (Sarti y col., 2012). Por esta razón, su efecto podría no ser evidenciado *in vitro* por la técnica utilizada (dada la ausencia de sustratos de las NOS y la labilidad de la inhibición por el NO), pero sí cobrar relevancia *in vivo* en el presente modelo.

De acuerdo con estos resultados, una alteración de la función mitocondrial y la consecuente reducción del consumo de O_2 cardíaco sería un hallazgo esperable en las primeras etapas de algunas de las principales afecciones cardiovasculares asociadas a la exposición al MP, como la insuficiencia cardíaca (Neubauer, 2007). De esta manera, una utilización deficiente del O_2 a nivel mitocondrial inducida por la inhalación de MP impactaría negativamente sobre la progresión de esta enfermedad, explicando, al menos en parte, algunos de los efectos adversos producidos por la exposición a MP.

Estudios previos de otros laboratorios han mostrado en células de epitelio respiratorio humano A549 una disminución del $\Delta\Psi_m$ provocada por la exposición al MP (Upadhyay y col., 2003) y sus metales transición asociados (Di Pietro y col., 2011). Es por ello que el siguiente paso fue evaluar si la exposición a ROFA induce cambios en el $\Delta\Psi_m$ mitocondrial. Se observó una despolarización de la membrana interna mitocondrial en corazón de ratones expuestos a ROFA, tanto en estado de respiración activa como pasiva (Figura 36). En relación a lo observado en el análisis del consumo de O_2 mitocondrial en los diferentes estados metabólicos, esta situación podría ser causada por una oxidación deficiente de los sustratos o por transporte deficiente de electrones a través de la en la cadena respiratoria. A nuestro entender, este estudio sería el primero en el que dicha alteración funcional se describe en mitocondrias aisladas de corazón.

Dado que el gradiente electroquímico de H^+ a los lados de la membrana interna mitocondrial es la fuerza impulsora para la síntesis de ATP, dicha despolarización mitocondrial podría contribuir a un suministro deficiente de ATP a la célula, lo que llevaría a una disfunción bioenergética cardíaca e insuficiencia orgánica luego de la exposición al MP. Es por ello que se evaluó el contenido y la velocidad de producción de ATP en mitocondrias aisladas de corazón luego del tratamiento con ROFA. El estado energético cardíaco no puede definirse simplemente por la concentración de ATP tisular en estado

estacionario (≈ 10 mM), sino por la cantidad de ATP sintetizado y utilizado por minuto. Teniendo en cuenta que esta concentración es relativamente pequeña en comparación con las demandas energéticas (las cuales son cerca de 10000 veces mayores), el corazón debe sintetizar ATP continuamente a fin de mantener la homeostasis cardíaca (Ingwall, 2009). En nuestro trabajo, a pesar de la disminución observada en la respiración mitocondrial y en el $\Delta\Psi_m$, el contenido de ATP mitocondrial no sufrió cambios significativos luego de la exposición aguda a ROFA (Tabla 3). Se ha descrito que la disminución del contenido de ATP tisular durante la insuficiencia cardíaca es lenta y progresiva ($\approx 0,35\%$ del pool de ATP por día) (Shen y col., 1999), lo que sugeriría que una disminución en el contenido de ATP tisular no sería detectada hasta que el corazón se encuentre severamente afectado. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado una disminución en la velocidad de producción de ATP mitocondrial de un 52% en los ratones expuestos a ROFA (Tabla 3). Esto indicaría que el suministro de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial se encuentra limitada en los ratones expuestos a la suspensión de ROFA. En consecuencia, no todo el O_2 consumido por la mitocondria se convertiría adecuadamente en energía química en la forma de ATP, como lo indica la menor relación P/O observada en el grupo de animales expuestos a ROFA con respecto al control. En este contexto, la producción de energía podría ser un paso limitante para la correcta función del corazón frente a aumentos en el trabajo cardíaco. Tales alteraciones han sido descritas en cardiomiocitos sometidos a una sobrecarga de Fe *in vitro* (uno de los metales de transición presente en más alta proporción en ROFA), donde la disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria se correlacionaron con bajos niveles de ATP, en condiciones depresoras de la contractilidad cardíaca (Link y col., 1998).

La exposición a ROFA no sólo indujo alteraciones bioenergéticas, sino que también provocó una disminución de la reserva contráctil y diastólica cardíaca. El análisis de los datos presentados en las Figuras 38 y 39 indican que, a pesar de que la contractilidad y relajación basales estarían conservadas luego de una exposición aguda al MP, el corazón no responde adecuadamente cuando se requiere un mayor trabajo cardíaco. El ISO actúa en el corazón como un agonista de los receptores β_1 adrenérgicos, induciendo un efecto inotrópico y cronotrópico positivo a través del aumento de la biodisponibilidad y del flujo intracelular de Ca^{2+} . De esta manera, al ser agregado a la línea de perfusión del sistema de Langendorff, el ISO promueve un aumento de la fuerza de contracción y de la frecuencia cardíaca, lo que simula un aumento del trabajo cardíaco (Sicari y col., 2008). Para que el efecto del ISO sea completo es necesario un aporte apropiado de ATP, dado que el mismo es fundamental tanto para la contracción y relajación del miocardio, como para mantener un flujo de Ca^{2+} intracelular adecuado, especialmente durante el esfuerzo. De hecho, se ha reportado recientemente que una exposición aguda a MP induce una disminución de la actividad de la Na^+-K^+ ATPasa y Ca^{2+} ATPasa en corazón de rata, enzimas centrales en la regulación de la concentración intracelular del Ca^{2+} (Li y col., 2015). De esta manera, la disminución observada en la velocidad de producción de ATP mitocondrial en el corazón de los ratones expuestos a ROFA (Tabla 3) podría afectar negativamente a la homeostasis del Ca^{2+} , explicando el efecto encontrado

en respuesta al estímulo con ISO en este grupo. Esta idea se apoya en la observación de que el aumento inducido por ISO en el consumo de O₂ cardíaco en los animales control fue atenuado en ratones expuestos a ROFA (Figura 40). Finalmente, la correlación lineal positiva entre el consumo de O₂ tisular y la PDVI observada para el grupo control se perdió en los ratones expuestos a ROFA (Figura 41). Tomados en conjunto, los cambios en el consumo de O₂ cardíaco (indicativo de la tasa metabólica del mismo) tienen un impacto directo sobre la contractilidad cardíaca, la cual se ve afectada en los ratones expuestos ROFA debido a una alteración de la función mitocondrial. En este grupo, el suministro deficiente de ATP mitocondrial conduce a una disfunción bioenergética que impide que los cardiomiocitos mantengan un trabajo contráctil adecuado cuando aumenta el gasto cardíaco.

Como se ha mencionado, la población mitocondrial en las células cardíacas en condiciones fisiológicas oscila entre el estado de respiración pasiva y activa, en un punto intermedio generalmente más cercano a la respiración pasiva (Boveris y Boveris, 2007). En consecuencia, las mitocondrias utilizan sólo una fracción de su capacidad máxima (equivalente al consumo de O₂ en la respiración activa) en condiciones basales. La diferencia entre ambos estados se denomina capacidad de reserva bioenergética de la mitocondria, y está disponible en los cardiomiocitos para el mantenimiento de la función del órgano cuando la demanda de energía se incrementa (Hill y col., 2009). Habiendo observado que la función contráctil se encuentra conservada en condiciones basales pero se pierde luego de un estímulo β -adrenérgico, y teniendo en cuenta la discusión sobre la evaluación de la función mitocondrial, una pérdida de la capacidad de reserva bioenergética de la mitocondria en los ratones expuestos ROFA podría explicar la alteración de la función cardíaca observada cuando aumenta el trabajo cardíaco. La disminución de esta reserva también fue descrita en otros modelos experimentales emulando alteraciones del metabolismo oxidativo cardíaco, tales como cardiomiocitos de rata (Hill y col., 2009) y ratón (Sansbury y col., 2011) incubados con 4-hidroxinonal, un subproducto de la peroxidación lipídica que se acumula en el corazón durante la isquemia (Eaton y col., 1999) y en la insuficiencia cardíaca (Nakamura y col., 2002).

Estas observaciones resaltan la importancia del mantenimiento de una adecuada capacidad de reserva bioenergética de la mitocondria en el corazón, para hacer frente a situaciones de incremento del gasto cardíaco. Los cambios descritos producto de la exposición a ROFA podrían significar una etapa temprana de las alteraciones cardíacas observadas luego de la inhalación del MP. Este estado, si se mantiene en el tiempo, podría contribuir a la aparición y progresión de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la exposición al MP, especialmente del IAM y la insuficiencia cardíaca.

4. CINÉTICA DE LA OCURRENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN SISTÉMICA

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición al MP se correlaciona positivamente con la aparición de marcadores sistémicos de estrés oxidativo (Delfino y col., 2011) e inflamación (van Eeden y col., 2001; Riediker, 2007; Calderón-Garcidueñas y col., 2008). Sin embargo, la

evidencia disponible se limita al estudio de poblaciones susceptibles, como los ancianos y aquellos con enfermedades cardiopulmonares preexistentes (Delfino y col., 2008), o debido a exposiciones ocupacionales (Rossner y col., 2007). Por ello, estas observaciones aportan poca información a la posible relación existente entre la aparición de estos marcadores con los efectos adversos sobre el sistema cardiovascular producidos por la inhalación de MP.

Con el fin de estudiar los fenómenos subyacentes a las alteraciones hasta aquí descritas de la función cardíaca en ratones expuestos a ROFA, se evaluó la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica luego de una exposición aguda al MP. El aumento de marcadores sistémicos de daño oxidativo a macromoléculas, junto con una disminución de las defensas antioxidantes en plasma, indicaría que la detoxificación de las especies activas del O₂ no es adecuada, produciendo una situación de estrés oxidativo que llevaría a daño oxidativo a lípidos y proteínas del plasma. El aumento de los productos finales de los procesos de peroxidación lipídica fue el marcador que se modifica más temprano luego de la exposición aguda a ROFA, como se observa por los niveles aumentados de TBARS en plasma transcurridas 1 y 3 h luego del tratamiento (Figura 42A). También se observó una acumulación de grupos carbonilos en las proteínas plasmáticas de estos animales, pero a las 3 y 5 h luego de la exposición (Figura 42B). Un perfil similar se había observado previamente en tejido pulmonar en el mismo modelo (Magnani y col., 2011), lo que podría indicar que el aumento de los niveles plasmáticos de estos marcadores de daño oxidativo puede ser resultado de la translocación de los mismos desde el pulmón a circulación sistémica. Sin embargo, es poco probable que este mecanismo sea el único contribuyente a esta observación. Se ha postulado que las PUF y/o algunos de sus constituyentes pueden ser capaces de atravesar el epitelio respiratorio, llegando a circulación sistémica en cuestión de minutos (Nemmar y col., 2002; Wallenborn y col., 2007). Por lo tanto, un efecto prooxidante directo de las partículas ROFA, o de sus componentes solubles (es decir, de los metales de transición), sobre las macromoléculas del plasma también podrían contribuir a esta observación. La secuencia temporal de la aparición de ambos marcadores de oxidación a macromoléculas es también consistente con la diferente susceptibilidad al daño oxidativo de los lípidos y proteínas, como se ha mostrado anteriormente (Gurgueira y col., 2002). En concordancia con nuestros resultados, el daño oxidativo a macromoléculas del plasma es un hallazgo frecuente en asociación con factores de riesgo cardiovasculares, lo que fortalece el vínculo entre los contaminantes atmosféricos y el estrés oxidativo, con la aparición y progresión de estas enfermedades (Lee y col., 2012).

En cuanto a las defensas antioxidantes, la respuesta más temprana observada fue el cambio en los niveles de GSH y GSSG (Tabla 4). La disminución de la concentración del GSH en plasma, junto con el aumento del nivel de GSSG, condujo a una relación GSH/GSSG disminuida (indicador del estado redox) en los ratones expuestos ROFA. Esta relación se mantuvo por debajo de los valores control en cada uno de los tiempos evaluados. Consistentemente, también se observó una disminución en el contenido de ácido ascórbico plasmático en los ratones expuestos a ROFA (Figura 43). La capacidad de ROFA de

disminuir los niveles de estas defensas antioxidantes ya habían sido reportadas en modelos *in vitro* (Mudway y col., 2004). Estos resultados, junto con el aumento de marcadores de daño oxidativo a macromoléculas del plasma, indican un desplazamiento del estado redox sistémico hacia un entorno más oxidante en los ratones expuestos a ROFA. Este hallazgo parecería encontrarse relacionado con el potencial prooxidante del mismo, así como con su habilidad de inducir una respuesta proinflamatoria al ser inhalado (Møller y col., 2010).

El consumo de las defensas antioxidantes sistémicas, junto con el aumento de la concentración en estado estacionario de las especies activas del O_2 (como lo sugiere el aumento de los marcadores plasmáticos de daño oxidativo a macromoléculas), indicarían que la exposición a ROFA induce una situación de estrés oxidativo a nivel sistémico. Por su parte, la actividad plasmática de SOD mostró una respuesta más compleja (Figura 44). Esta enzima antioxidante se encuentra a menudo disminuida en una amplia variedad de situaciones fisiopatológicas asociadas al estrés oxidativo. Por otro lado, es también modulada positivamente como una adaptación al aumento en la producción de especies oxidantes, o en consecuencia de un estado proinflamatorio (Fattman y col., 2003). En el presente modelo, la actividad de SOD disminuyó a las 3 h en los ratones expuestos a ROFA. Esta asociación inversa entre la actividad SOD y la exposición al MP ha sido descrita anteriormente (Delfino y col., 2008), y se sugiere como componente central en la progresión de la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad coronaria (Landmesser y col., 2000). Por otro lado, el aumento en la actividad de SOD a las 5 h podría indicar una respuesta adaptativa al estrés oxidativo sistémico provocado por la instilación de ROFA a tiempos más cortos. Consistentemente con este resultado, el aumento en la actividad de SOD también se ha observado en pulmón y corazón luego de una exposición aguda a este tipo de MP (Gurgueira y col., 2002; Magnani y col., 2011).

En su conjunto, estos resultados indican que una exposición aguda a ROFA conduce a la ocurrencia de estrés oxidativo sistémico, además de las alteraciones del metabolismo oxidativo cardiopulmonar descritas anteriormente. En este sentido, los principales parámetros modificados 1 h luego del tratamiento fueron un aumento de la peroxidación lipídica junto con una disminución de la relación GSH/GSSG. A las 3 h, se evidencia estrés oxidativo sistémico, caracterizado por un aumento del daño oxidativo a lípidos y proteínas (como lo indican el contenido de TBARS y grupos carbonilo, respectivamente), y por una disminución de las defensas antioxidantes (relación GSH/GSSG, contenido de ácido ascórbico y actividad de SOD). A pesar de que a las 5 h aún se observa un aumento del contenido plasmático de grupos carbonilo, y una disminución de la relación GSH/GSSG y de ácido ascórbico, también se evidencia la aparición de una respuesta adaptativa (que incluye el aumento de la actividad de SOD y la disminución del contenido de TBARS) (Figura 76). Cabe señalar que estas alteraciones no parecerían estar acompañadas de daño tisular significativo en pulmón o corazón, como lo indican las actividades de LDH y CK en plasma, que no mostraron cambios con respecto al grupo instilado con solución fisiológica.

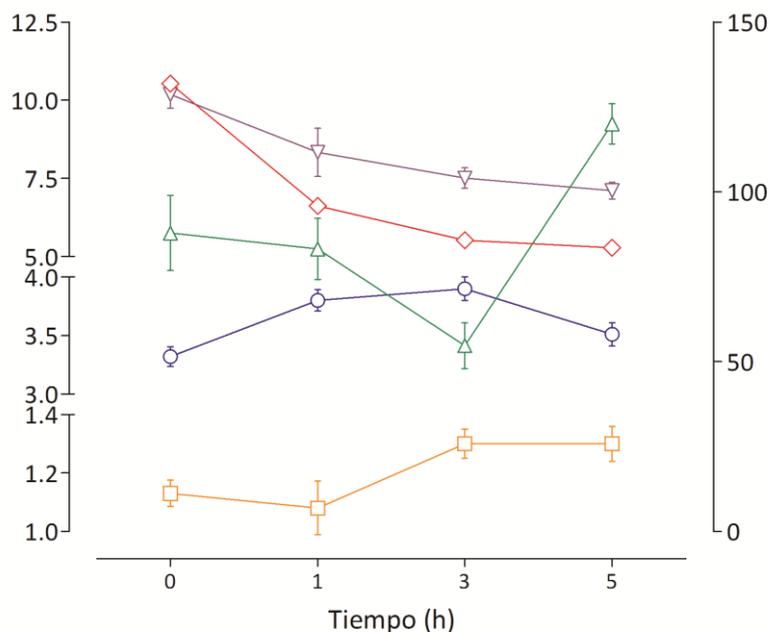


Figura 76. Evolución temporal de los cambios en los niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo en ratón luego de una exposición aguda a ROFA. Los valores correspondientes a los grupos control se agruparon en tiempo = 0 h. Eje X izquierdo: ○ TBARS (μM); □ Carbonilos (nmol/mg proteína); ◇ GSH/GSSG; ▽ Ácido ascórbico (μM). Eje X derecho: △ SOD (U/L).

El estrés oxidativo pulmonar provocado por la inhalación de MP modula la actividad de factores de transcripción sensibles al estado redox, como por ejemplo NF-κB, lo que induce la producción de citoquinas, quimioquinas y proteínas de fase aguda, y da inicio a una respuesta inflamatoria a nivel local (Samet y col., 2002). Esta situación parecería no estar limitada únicamente al tejido pulmonar, dado que el aumento de mediadores proinflamatorios en circulación luego de la inhalación de MP sugiere una respuesta sistémica (Brook y col., 2010). En el presente modelo, la exposición aguda a ROFA indujo un aumento de citoquinas proinflamatorias (TNF-α e IL-6) en plasma, con un máximo a las 3 h (Figura 45). Cabe destacar que este tiempo de 3 h coincide con los valores más bajos de consumo de O₂ cardíaco en los ratones expuestos a ROFA (Figura 32). Esto sugiere que una respuesta inflamatoria sistémica podría explicar, al menos en parte, las alteraciones observadas en corazón. De hecho, el rol de TNF-α e IL-6 como mediadores de la progresión de la enfermedad en la insuficiencia cardíaca ha sido reportado previamente (Mariappan y col., 2009; Hohensinner y col., 2011). Por otra parte, este estado proinflamatorio también puede estar relacionado con el aumento de la actividad de SOD en plasma a las 5 h, ya que esta enzima antioxidante se modula positivamente en condiciones inflamatorias como una respuesta adaptativa (Fattman y col., 2003).

En la evolución de la respuesta inflamatoria sistémica provocada por ROFA, también se observa un aumento en los niveles plasmáticos de IL-10 a las 5 h. Esta citoquina antiinflamatoria es regulada positivamente con el fin de limitar los efectos de TNF-α e IL-6 (Saraiva y O'Garra, 2010). En ratones expuestos a ROFA, la IL-10 podría desempeñar un papel en la resolución de la respuesta inmune, lo que

explicaría la disminución observada en los niveles de TNF- α e IL-6 a las 5 h luego del tratamiento. Asimismo, la rápida inducción de esta respuesta regulatoria podría ser una de las razones por la cual no se observan diferencias en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias en algunos estudios, cuando se evalúan los efectos de la exposición aguda al MP a tiempos más prolongados. Por otro lado, se observó un aumento en los niveles plasmáticos de IFN- γ a las 5 h luego del tratamiento. Esta citoquina es producida principalmente por los linfocitos T y NK, favoreciendo la activación de macrófagos (Schroder y col., 2004).

Los niveles de citoquinas en homogeneizados de pulmón también fueron evaluados con el fin de dilucidar el origen de las citoquinas aumentadas en plasma (Figura 45). El curso temporal de los cambios en los niveles de TNF- α e IL-6 pulmonares en los ratones expuestos a ROFA fue en paralelo a lo observado en circulación periférica. Sin embargo, las magnitudes de estos aumentos fueron mayores en plasma que en homogeneizado de pulmón (en particular para la IL-6). Por otra parte, no se observó inducción pulmonar alguna de IL-10 o IFN- γ , apoyando la idea de fuentes de citoquinas diferenciales, distintas al pulmón (Figura 46). Además, los leucocitos PMN circulantes mostraron una mayor actividad 1, 3 y 5 h luego de la exposición a ROFA (como se indica por las señales de DCF y DAF-2) (Figuras 47 y 48). Esta subpoblación de leucocitos es capaz de responder a diversas citoquinas proinflamatorias, como al TNF- α , produciendo a su vez una gran variedad de mediadores solubles tales como quimioquinas, otras citoquinas, y factores promotores de la angiogénesis (Mantovani y col., 2011). De esta manera, la activación de leucocitos PMN puede contribuir significativamente a los niveles de citoquinas plasmáticas observados en los ratones expuestos a ROFA.

Durante el estallido respiratorio, los leucocitos PMN activados producen $O_2^{\bullet-}$, debido principalmente a la activación de las NOX. El $O_2^{\bullet-}$ puede, a su vez, dismutar a H_2O_2 en una reacción controlada por difusión catalizada por la SOD. Trazas solubles de metales de transición, como los principales constituyentes de las partículas ROFA, son capaces de producir una ruptura heterolítica del H_2O_2 y producir HO^{\bullet} . Esta vía podría ser la causante del aumento de la peroxidación lipídica y disminución de la relación GHS/GSSG observada en plasma de ratones expuestos a ROFA, tan rápido como 1 h luego del tratamiento. Alternativamente, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el NO para producir $ONOO^-$, un poderoso agente oxidante y nitrante. Dado que la producción de NO se encuentra incrementada en los leucocitos PMN a las 3 y 5 horas luego de la exposición a ROFA, hipotetizamos que el $ONOO^-$ podría contribuir al daño oxidativo observado a las macromoléculas del plasma. Por otro lado, es sabido que la formación de $ONOO^-$ disminuye la biodisponibilidad de NO, lo que podría estar relacionado con la alteración de la dilatación de las arteriolas dependiente de NO luego de una exposición ROFA, como otros autores han descripto previamente (Nurkiewicz y col., 2004).

Tomados en conjunto, estos resultados indicarían que la exposición aguda a ROFA promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias desde el pulmón, las cuales podrían llegar a circulación sistémica y activar otros tipos celulares. Así, se amplificaría aún más la respuesta inflamatoria,

induciendo la activación de PMN circulantes, la ocurrencia de estrés oxidativo y promoviendo además una respuesta inmune del tipo regulatoria. En este escenario, tanto la contribución del pulmón como la activación de leucocitos PMN circulantes podrían explicar el aumento observado en los niveles de citoquinas proinflamatorias y marcadores de daño oxidativo a macromoléculas en el plasma de ratones expuestos a ROFA.

5. MECANISMOS E IMPLICANCIAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN AL MP

El aumento de TNF- α e IL-6 en pulmón y plasma luego de una exposición aguda a ROFA indica que la inhalación del MP induce una respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico. Sin embargo, estas observaciones no aclaran cuáles son los mecanismos inflamatorios activados luego de la exposición al MP, o de cuáles son los mediadores involucrados en este proceso.

Para identificar los mediadores inflamatorios implicados en la respuesta inmune local a ROFA, así como sus fuentes, se analizaron muestras de BAL luego de una exposición aguda al MP. Como se ha reportado previamente (Costa y Dreher, 1997), en los animales instilados con ROFA se observa un mayor número de leucocitos (mayoritariamente de la serie mieloide) y un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias en el BAL con respecto al control (Figuras 49 y 50). Esta situación es indicativa de la inducción de una respuesta inflamatoria innata a nivel local, y presenta las características de un proceso agudo en sus etapas más tempranas, dado que predomina el infiltrado de neutrófilos por sobre el de los monocitos y macrófagos (Figura 49B). El TNF- α y la IL-6, entre otras acciones, favorecen la activación del endotelio e infiltración de neutrófilos (Abbas y col., 2012), mientras que MCP-1 actúa como un poderoso factor quimiotáctico para macrófagos (Deshmane y col., 2009). La liberación de estas citoquinas en respuesta a la inhalación del MP favorecería la migración de neutrófilos y monocitos desde circulación sistémica hacia el foco inflamatorio en el tejido pulmonar, explicando el mayor infiltrado de células inflamatorias.

Se ha sugerido que la presencia de metales de transición en el MP amplifica la respuesta inflamatoria local, por inducción de daño oxidativo al tejido a través de reacciones tipo Fenton (Chen y Lippmann, 2009). De hecho, se ha observado que la infiltración de células inflamatorias y el daño pulmonar en respuesta a una exposición a ROFA puede ser reproducida al administrar únicamente la fracción soluble de ROFA libre de partículas (Gavett y col., 1997). La respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo local son procesos que se encuentran íntimamente relacionados, y podrían ocurrir en el caso de la inhalación de MP con altas concentraciones de metales de transición como ROFA. Esta sugerencia está basada en los resultados obtenidos en un modelo de exposición aguda a ROFA en ratones, donde se encontraron incrementos en la infiltración de células inflamatorias en pulmón junto con aumentos en los niveles de TNF- α en muestras de BAL. El hallazgo más relevante de este trabajo es que la aparición de estos signos de inflamación local fueron revertidos completamente al repetir la exposición en ratones transgénicos que sobreexpresaban la enzima antioxidante EC-SOD (Ghio y col., 2002b). Experimentos *in*

in vitro realizados en células de epitelio bronquial humanas (NHBE) incubadas con partículas ROFA confirmaron estos resultados. Mientras que ROFA indujo la liberación de IL-6, IL-8 y TNF- α a partir de dichas células, este efecto se revirtió al repetir el experimento en presencia del antioxidante dimetiltiourea o del quelante de metales deferoxamina (Carter y col., 1997). Efectos similares han sido reportados en la línea celular de epitelio respiratorio humano A549 (Stringer y col., 1998).

Diversos estudios *in vitro* y *ex vivo* han mostrado que la exposición al MP induce no solo la infiltración de células inflamatorias, sino también su activación. Se ha observado que las partículas ROFA interactúan con macrófagos en cultivo, promoviendo la ocurrencia de estrés oxidativo luego de su internalización (Goldsmith y col., 1997), y la liberación de TNF- α (Goldsmith y col., 1998). El presente trabajo de tesis es uno de los primeros en el que se combinan la citometría de flujo y la marcación de antígenos de superficie e intracelulares para citoquinas, con el objetivo de identificar la principal subpoblación de leucocitos involucrada en la respuesta inmune local *in vivo* al MP. Se observó que los macrófagos alveolares son las principales células productoras de TNF- α e IL-6 en el presente modelo, y que los neutrófilos contribuyen parcialmente con la producción de IL-6 en el grupo instilado con ROFA (Figura 51). En cuanto a MCP-1, una posible fuente que explique sus niveles aumentados en el BAL luego de la exposición al MP podrían ser los neumocitos tipo II del epitelio respiratorio, dado que estas células producen cantidades significativas de esta citoquina en respuesta a los mediadores proinflamatorios liberados por los macrófagos alveolares una vez activados (Standiford y col., 1991). Un efecto directo de ROFA sobre los neumocitos tipo II podría también contribuir con la liberación de MCP-1. En este sentido, no existe evidencia de ello documentada hasta la fecha, aunque se ha reportado que el estrés oxidativo, como el que ocurre a nivel local luego de una exposición a ROFA (Magnani y col., 2011), es capaz de inducir la liberación de MCP-1 a partir de dichas células (Deshmane y col., 2009). En su conjunto, estos hallazgos ubicarían a los macrófagos alveolares como la principal subpoblación celular encargada de orquestar la respuesta inmune local luego de una exposición aguda al MP.

En cuanto a los efectos sistémicos de la respuesta inflamatoria inducida por el MP, se observó que la instilación de ROFA indujo la extravasación de leucocitos en venas del lecho mesentérico (Figura 52A). Este efecto ha sido reportado previamente en venas del músculo espinotrapecio de ratas expuestas a ROFA, aunque utilizando una dosis equivalente 8 veces mayor (2 mg por animal) (Nurkiewicz y col., 2004) y tiempos más prolongados (24 h) (Nurkiewicz y col., 2006). En estos estudios, se observó que los leucocitos PMN son la población mayoritaria que migra hacia el tejido circundante a los vasos sanguíneos, lo cual se encontró asociado a la deposición de MPO y ocurrencia de estrés oxidativo. Por otro lado, la disminución de la velocidad media de rodamiento (Figura 52C) sugiere una inducción de la expresión y activación de moléculas de adhesión en animales expuestos a ROFA. Esto indicaría que el estado proinflamatorio sistémico inducido por una exposición aguda al MP es capaz de favorecer mecanismos periféricos como la extravasación de leucocitos. Se postula que este proceso desempeñaría un rol fundamental en la infiltración de células inflamatorias en pulmón, así como en el

establecimiento y la progresión de las principales patologías cardiovasculares asociadas a la exposición al MP, como el AIM y el ACV.

Un evento clave en la activación de las células inflamatorias es la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de citoquinas y factores quimiotácticos, con el objetivo de dirigir la migración de las distintas subpoblaciones de leucocitos hacia el foco inflamatorio. En el caso de las P- y E-Selectinas endoteliales, y de la L-Selectina leucocitaria, la sola translocación de estas proteínas hacia la superficie de la célula favorece el rodamiento de leucocitos. Otra familia de moléculas de adhesión, las integrinas, requieren además de su expresión sobre la superficie de la célula, de un cambio de conformación que promueve un estado de mayor afinidad para la interacción con otras integrinas (Abbas y col., 2012). En el caso de CD11b (Mac-1), este cambio de conformación expone el epitope CBRM1/5, el cual fue utilizado como marcador de la activación *in vivo* de células mieloides luego de una exposición aguda al MP (Diamond y Springer, 1993). Mediante este acercamiento se comprobó en nuestro modelo que los neutrófilos circulantes se encuentran activados en los ratones expuestos a ROFA (Figura 54A), lo cual es consistente con lo descrito en el Capítulo II en cuanto a la activación de leucocitos PMN evaluada por citometría de flujo (Figuras 47 y 48). Esto indicaría que la exposición aguda al MP promueve la activación de neutrófilos en circulación sistémica, preparándolos para la extravasación hacia el foco inflamatorio e induciendo el estallido respiratorio, y dispararía la ocurrencia de estrés oxidativo a nivel sistémico.

Por otro lado, se encontró que otra de las subpoblaciones de leucocitos que se encuentra activada en circulación periférica de los ratones expuestos ROFA son los monocitos Gr-1⁺ (Figura 54A). El antígeno de superficie Gr-1 (también conocido como Ly-6C) permite diferenciar a los monocitos de ratón en 2 subtipos: uno que expresa Gr-1 en grandes cantidades (Gr-1⁺ o Ly-6C^{high}), y que representa el 50-60% de la población total de monocitos en condiciones fisiológicas; y otro que lo expresa en niveles relativamente más bajos (Gr-1⁻ o Ly-6C^{low}) (Geissmann y col., 2003). Estas dos subpoblaciones son mediadoras de distintas funciones biológicas. Por un lado, los monocitos Gr-1⁺ tienen un fenotipo predominantemente proinflamatorio, dado que expresan altos niveles de CCR2 (un receptor para MCP-1), y liberan MPO y citoquinas inflamatorias (como TNF- α) una vez reclutados al foco inflamatorio. Por otro lado, los monocitos Gr-1⁻ (también llamados residentes) participan en la resolución de la inflamación, liberando IL-10 y diversos factores de crecimiento y angiogénesis luego de su reclutamiento. Una vez allí, los monocitos Gr-1⁺ se diferencian mayoritariamente a macrófagos, mientras que los Gr-1⁻ lo hacen a células dendríticas (Nahrendorf y col., 2010). La activación de los monocitos Gr-1⁺ en los ratones expuestos a ROFA indica que el estado proinflamatorio sistémico inducido por la inhalación del MP también comprende la activación de esta subpoblación de leucocitos en sangre, lo que facilitaría su migración hacia focos inflamatorios en respuesta a un estímulo adecuado, como MCP-1, e intensificarían una respuesta inmune del tipo proinflamatoria en el tejido afectado.

Los niveles aumentados de sICAM-1 y sVCAM-1 en plasma de los ratones expuestos a ROFA (Figura 54B) indican que también existe cierto nivel de activación del endotelio en este grupo. Se ha

reportado que el aumento de estos marcadores en circulación se correlaciona positivamente con la incidencia de IAM en humanos (Luc y col., 2003). Este hallazgo podría estar asociado con el mayor riesgo de sufrir un IAM en relación a la exposición a altos niveles de MP, como lo indican diversos estudios epidemiológicos (Pope y col., 2004; Zanobetti y Schwartz, 2007). Esto contribuiría a explicar, al menos en parte, la mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares asociadas a la inhalación de MP (Brook y col., 2010). Tomados en su conjunto, estas observaciones indican que una exposición aguda a MP promueve mecanismos proinflamatorios periféricos, como la extravasación de leucocitos, a través de la inducción de la expresión y activación de moléculas de adhesión en células mieloides y endoteliales.

Teniendo en cuenta que los macrófagos alveolares parecerían ser la principal fuente de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la inhalación del MP, y que los precursores de esta subpoblación de leucocitos (es decir, los monocitos) se encuentran activados en circulación periférica, se evaluó el efecto de la exposición a ROFA en un modelo animal carente de monocitos maduros en sangre. Mediante este acercamiento, se buscó confirmar el rol central de esta subpoblación de leucocitos en la respuesta inflamatoria local y sistémica inducida por la inhalación de MP. Para ello, se utilizaron liposomas cargados con clodronato, administrados por vía i.v. 24 h antes de la exposición a ROFA. Una vez internalizado por las células fagocíticas mononucleares mediante endocitosis, los liposomas son digeridos por las fosfolipasas lisosomales y el clodronato se combina con el AMP para formar β,γ -metilen-adenosina-5'-trifosfato, un análogo no hidrolizable del ATP. Este metabolito actúa como un inhibidor competitivo de la ADP-ATP translocasa en la membrana interna mitocondrial, induciendo una caída del $\Delta\Psi_m$, apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, liberación de citocromo *c* y, en última instancia, muerte celular por apoptosis al cabo de 24 h (Lehenkari y col., 2002). Al ser altamente hidrofílico, el clodronato no atraviesa las membranas celulares en su forma libre. Además, su vida media en plasma es extremadamente corta, dado que es eficientemente eliminado de circulación por el sistema renal. Por otro lado, los liposomas no son capaces de atravesar las barreras vasculares, como las paredes de los capilares. De esta manera, las características que presenta este modelo experimental permiten que la depleción de distintas subpoblaciones de monocitos sea altamente específica según la vía de administración utilizada (van Rooijen y Hendriks., 2010). En el presente trabajo, se utilizó la vía i.v. de forma tal de eliminar únicamente a los monocitos presentes en sangre, medula ósea, bazo e hígado, sin afectar a los macrófagos alveolares (Figura 25 y 26). En este modelo de ratones carentes de monocitos maduros en circulación periférica, la exposición a ROFA no mostro signos de inflamación, ya sea a nivel local o sistémico. Este resultado sugiere que la migración de monocitos circulantes hacia el pulmón es un evento clave tanto en la amplificación de la respuesta inmune local, como en la progresión hacia una respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Consistentemente con estos resultados, se ha reportado que la depleción de monocitos circulantes (pero no de los macrófagos alveolares residentes) inducida por clodronato, atenúa la liberación de

citoquinas y el reclutamiento de células inflamatorias en pulmón en un modelo animal de inflamación aguda del tracto respiratorio (Zasłona y col., 2014).

Por último, se evaluó el posible rol de la inhalación de MP en la progresión del IAM. Esta patología es la principal causa de muerte en relación a la exposición a la contaminación ambiental, ascendiendo a más de 2,5 millones de casos alrededor del mundo en el año 2012 (OMS, 2014). Luego de sufrir un IAM, un adecuado balance en el reclutamiento de monocitos Gr-1⁺ y Gr-1⁻ a la zona infartada es fundamental para un buen pronóstico (Nahrendorf y col., 2010). Se ha mostrado que esta migración sigue un perfil temporal bifásico, caracterizado por la infiltración de monocitos Gr-1⁺ durante los primeros días posteriores al IAM, para promover la digestión del tejido infartado y remover restos de necrosis, seguido de la migración de monocitos Gr-1⁻ en los días subsiguientes, para resolver la inflamación e inducir la reparación de la zona afectada (Nahrendorf y col., 2007). La liberación de distintas citoquinas junto con la expresión diferencial de sus receptores en las distintas subpoblaciones de monocitos parecería dirigir este proceso, donde MCP-1 desempeña un rol central en el reclutamiento de monocitos Gr-1⁺ durante la fase inicial. De hecho, se ha observado que niveles aumentados de monocitos Gr-1⁺ se encuentran asociados a un peor pronóstico luego de sufrir un IAM, tanto en humanos (Tsujioka y col., 2009) como en modelos animales (Panizzi y col., 2010). En el presente trabajo de tesis se observó un efecto similar causado por la inhalación de MP, dado que en los ratones expuestos a ROFA se observó un mayor infiltrado de estas células en la zona afectada (Figuras 57B y 59), así como un mayor tamaño de infarto (Figuras 57A y 58). Esta situación podría estar favorecida por el estado proinflamatorio sistémico inducido por la inhalación de MP, específicamente por el aumento del tráfico de neutrófilos y monocitos hacia focos inflamatorios desde circulación periférica, a través de la inducción de la expresión y activación de moléculas de adhesión en células mieloides y endoteliales. De esta manera, la inhalación de MP agravaría las consecuencias del IAM, lo que podría representar uno de los mecanismos a través de los cuales se observa un aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular asociada a la exposición a la contaminación ambiental.

6. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES Y ENDOTELIALES

La exposición a ROFA parecería inducir la activación de macrófagos alveolares en el pulmón y de células de la serie mieloide y endoteliales en circulación periférica, con importantes efectos adversos sobre el sistema cardiovascular. Dicha activación podría deberse a un efecto directo de las partículas ROFA (o de alguno de sus constituyentes) sobre las distintas poblaciones celulares mencionadas; o a un efecto indirecto como consecuencia de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición al MP. Por esta razón, se utilizaron dos acercamientos *in vitro* distintos para estudiar los mecanismos a través de los cuales ocurre la activación de dichas células: a) la incubación con concentraciones crecientes de partículas ROFA en suspensión, y b) la incubación con plasma proveniente de ratones expuestos a ROFA. En el segundo caso, las muestras de plasma fueron obtenidas transcurridas 3 h luego de la instilación del

MP, dado que en este punto se observa el pico de aumento de citoquinas proinflamatorias a nivel sistémico (Figura 45).

En cuanto al efecto directo sobre macrófagos, se observó que las partículas ROFA promueven tanto la expresión y activación de CD11b (Figura 60), como la liberación de citoquinas proinflamatorias al medio de cultivo (Figura 61). Estos resultados concuerdan y extienden lo observado en estudios previos, donde se mostró que las partículas ROFA son internalizadas por macrófagos alveolares de hámster *in vitro*, por un proceso que depende de la acción de receptores tipo *scavenger* e induce la ocurrencia de estrés oxidativo (Goldsmith y col., 1997). Mediante el uso de inhibidores selectivos de la cadena respiratoria mitocondrial (antimicina y rontenona) y de las NOX (DPI), se confirmó que el incremento en la producción de especies activas del O₂ inducido por la incubación con ROFA proviene mayoritariamente del metabolismo mitocondrial (Becker y col., 2002). Estos resultados han sido corroborados *in vivo* en muestras de BAL obtenidas de ratones expuestos a ROFA (Nurkiewicz y col., 2004 y 2006). Asimismo, se ha reportado que la incubación *in vitro* de macrófagos alveolares humanos con ROFA promueve la liberación de TNF- α e IL-6 al medio de cultivo (van Eeden y col., 2001). Utilizando el sobrenadante de este medio de cultivo, se ha mostrado que las citoquinas presentes en él inducen la expresión de ICAM-1 y la liberación de MCP-1 e IL-8 en células de epitelio respiratorio humano A549 y HBEC (Ishii y col., 2004). Mientras que MCP-1 actúa como un factor quimiotáctico para macrófagos (Deshmane y col., 2009), la IL-8 es un potente mediador de la quimiotaxis de neutrófilos (Kobayashi, 2008). La liberación de estas citoquinas desde el epitelio respiratorio en respuesta a la activación de los macrófagos alveolares, sumadas a las propias citoquinas liberadas por estos macrófagos y a la inducción epitelial de ICAM-1, podrían comprender los principales mecanismos inflamatorios implicados en la infiltración de leucocitos en el pulmón, y posiblemente también en la posterior respuesta inmune a nivel sistémico.

Cabe destacar que la activación de receptores tipo *scavenger* promueve una respuesta inmune del tipo antiinflamatoria. De hecho, la administración de ROFA a ratones deficientes en el receptor MARCO (*macrophage scavenger receptor with collagenous structure*) o SR-AI/II (*scavenger* tipo AI/II) induce mayor inflamación y daño pulmonar en comparación con animales que presentan niveles normales de los mismos (Dahl y col., 2007). Dado que la respuesta local al MP es predominantemente proinflamatoria, se ha sugerido que los TLR también desempeñan un rol importante en el reconocimiento del MP por los macrófagos alveolares. Se ha reportado que la deficiencia la isoforma TLR4 en ratones previene la aparición de signos de inflamación local y sistémica en respuesta a la inhalación de MP, especialmente de los niveles aumentados de TNF- α y MCP-1 en pulmón y plasma (Kampfrath y col., 2011). Los principales ligandos de los TLR son los PAMPs, como el LPS y las endotoxinas. Estas moléculas se encuentran frecuentemente en muestras de MP proveniente de fuentes naturales (MP₁₀), pero son un componente minoritario en el MP de origen antropogénico como ROFA. Se postula, entonces, que en el caso de los modelos de exposición que utilizan este tipo de MP, la

activación de los TLRs se produce a través de la formación de DAMPs por daño oxidativo a distintas estructuras del sistema respiratorio, principalmente a los fosfolípidos del surfactante pulmonar (Miyata y van Eeden, 2011) y al ácido hialurónico de la membrana basal del epitelio pulmonar (Sato y col., 2001).

ROFA también mostró ejercer un efecto directo sobre la activación de monocitos (Figura 63), aunque no sobre la de neutrófilos (Figura 62). Este hallazgo concuerda con estudios previos *in vitro* que muestran una mayor susceptibilidad de los monocitos a ser activados por ROFA con respecto a los leucocitos PMN (Becker y col., 2002). Al incubar monocitos con la fracción soluble de ROFA, o con partículas ROFA lavadas, se encontró que la fracción soluble de ROFA parecería promover la activación de CD11b, mientras que las partículas ROFA lavadas inducirían su expresión. De cualquier manera, el efecto observado en ambos casos fue menor que cuando se incubaron los monocitos con la suspensión de ROFA original. Esto indica que los metales de transición presentes en ROFA podrían promover la activación de CD11b en monocitos, mientras que el centro de carbono de ROFA induciría su expresión. Sin embargo, el resultado es máximo cuando ambos componentes están presentes, sugiriendo un efecto sinérgico de los metales de transición cuando se encuentran formando parte de una partícula con respecto a cuándo se encuentran como sales solubles. Estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que el Fe, Ni y V en sus formas solubles son los principales responsables de estas observaciones, dado que la depleción de los mismos en las partículas ROFA disminuye significativamente su potencial citotóxico (Dreher y col., 1997).

En cuanto a la activación de células mieloides de forma indirecta, utilizando plasma de ratones expuestos a ROFA, se observó que las citoquinas proinflamatorias presentes en el mismo promueven la expresión y activación de CD11b en monocitos y neutrófilos. Por inhibición selectiva del efecto de estas citoquinas mediante el uso de anticuerpos bloqueantes, se comprobó que el TNF- α es el principal mediador inflamatorio involucrado en este proceso. Esta vía de activación indirecta de células mieloides circulantes podría explicar, al menos en parte, el mayor nivel de activación de CD11b en monocitos Gr-1⁺ y neutrófilos en los ratones expuestos a ROFA de forma aguda (Figura 65), así como el estallido respiratorio observado en leucocitos PMN en este grupo (Figura 47).

Estos hallazgos complementan algunas de las observaciones presentadas en el Capítulo III. En su conjunto, los resultados muestran que la inhalación del MP parecería inducir la activación de macrófagos alveolares en forma directa. Luego, las citoquinas proinflamatorias producidas por esta subpoblación promoverían la activación secundaria de neutrófilos en el pulmón, lo que, junto con la infiltración y posterior activación de monocitos y neutrófilos desde circulación periférica, amplificarían la respuesta inflamatoria local. La translocación de estos mediadores inflamatorios a circulación sistémica, especialmente del TNF- α , sería el principal responsable de la activación de monocitos y neutrófilos en sangre. Considerando que el MP, o alguno de sus constituyentes, pueden atravesar el epitelio respiratorio y llegar a circulación sistémica, un efecto directo de estos componentes sobre los monocitos también contribuiría a su activación. En cuanto a las células endoteliales, no se observó efecto alguno de

ROFA sobre la expresión de moléculas de adhesión de forma directa. Sin embargo, se observó que las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de los ratones expuestos a ROFA promueven la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Nuevamente, el principal mediador inflamatorio involucrado fue el TNF- α y, en menor medida, la IL-6. Esto indicaría que la activación del endotelio *in vivo* observada en el Capítulo III se debe principalmente a un efecto indirecto del MP, a través de la inducción de una respuesta inflamatoria sistémica.

7. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PREVIA DE INFLIXIMAB

El TNF- α es una citoquina pleiotrópica, característica del sistema inmune innato, que actúa como un importante mediador de la respuesta inflamatoria tanto a nivel local como sistémico. El TNF- α es producido por una amplia variedad de células, incluidas diversas subpoblaciones de leucocitos (principalmente los macrófagos), células endoteliales, cardiomiocitos, adipocitos, fibroblastos y neuronas, entre otras. Inicialmente, el TNF- α se sintetiza como una proteína transmembrana que se asocia como un homotrímero, el que luego es clivado para liberar al TNF- α en su forma circulante. Existen dos tipos de receptores para TNF- α , denominados TNFR1 y TNFR2, que se encuentran presentes en la mayoría de las células. La unión del TNF- α da lugar al reclutamiento de proteínas adaptadoras llamadas factores asociados al receptor de TNF- α (TRAF) que, a su vez, activan factores de transcripción (sobre todo el NF- κ B) o inducen apoptosis. La principal función del TNF- α es la de promover la atracción de neutrófilos y monocitos hacia el foco inflamatorio, y de activar estas células para eliminar el estímulo que dio origen a su liberación. Para ello, induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, la liberación de quimioquinas y otras citoquinas proinflamatorias por el macrófago y el estallido respiratorio en los neutrófilos. Cuando se libera en grandes cantidades, el TNF- α es capaz de inhibir, incluso, la contractilidad del miocardio y el tono del músculo liso vascular (Abbas y col., 2012).

En el presente trabajo de tesis se ha mostrado que, luego de una exposición aguda a ROFA, se liberan cantidades significativas de TNF- α , tanto a nivel pulmonar como sistémico (Figuras 45 y 46). Además, se observó que el TNF- α es la principal citoquina involucrada en la activación de células mieloides y endoteliales en los animales expuestos al MP (Figuras 66 y 69). Dado el reconocido rol de la inflamación sistémica como depresor de la función cardíaca, se analizó la inhibición de la respuesta inflamatoria dependiente de TNF- α en los ratones expuestos a ROFA, para concluir que ésta es la mediadora de los efectos adversos observados sobre el sistema cardiovascular.

Dado que el TNF- α se encuentra involucrado en la patogénesis de una variedad de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y psoriasis, entre otras, se han desarrollado diversos antagonistas para inhibir su acción de forma terapéutica (Sfikakis y col., 2010). Entre ellos se destaca el Infliximab, un anticuerpo monoclonal quimérico con alta afinidad y especificidad por el TNF- α , tanto en su forma soluble como

transmembrana (Knight y col., 1993). La región variable de la molécula de Infliximab corresponde a la forma humana de la IgG₁, mientras que la región constante proviene de ratón. Se ha reportado que el tratamiento con Infliximab previene la aparición de signos de inflamación local y sistémica en diversos modelos de patologías inflamatorias en ratones, y se ha corroborado su eficacia terapéutica en los desórdenes autoinmunes mencionados en humanos (Tracey y col., 2008).

En el presente modelo de exposición aguda a MP, se administró Infliximab en forma previa al tratamiento con ROFA y se evaluó su efecto sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en plasma, así como sus consecuencias sobre la función cardíaca. El tratamiento previo con Infliximab previno la aparición de signos de inflamación sistémica observados en los ratones expuestos a ROFA (Figura 70), Este bloqueo de la respuesta inflamatoria dependiente de TNF- α con Infliximab previno la disminución del consumo de O₂ en corazón (Figura 72), así como la disminución de la reserva contráctil y diastólica cardíaca (Figuras 73 y 74) inducida por la exposición a ROFA. Es importante mencionar que el tratamiento previo con Infliximab también recuperó la correlación entre los cambios en el consumo de O₂ tisular y la contractilidad cardíaca (Figura 75), que se había perdido en los animales expuestos a ROFA.

Tomados en su conjunto, estos resultados resaltan el rol central de la inflamación sistémica mediada por TNF- α en los efectos adversos observados sobre el corazón producto de una exposición aguda al MP. Estos hallazgos contribuyen a dilucidar los mecanismos a través de los cuales la inhalación de MP se encuentra asociada a incrementos en la morbilidad y mortalidad por afecciones cardiovasculares.

8. CONSIDERACIONES FINALES

En el presente trabajo de tesis se estudiaron los efectos adversos producidos por la exposición aguda al MP sobre el sistema cardiovascular, así como los mecanismos subyacentes en las observaciones encontradas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible hipotetizar acerca de la secuencia de eventos que se disparan luego de la inhalación de MP y que provocan, en última instancia, los efectos adversos observados en el corazón. Los mismos se resumen en la Figura 77.

En primer lugar, la exposición a ROFA promovería la activación de macrófagos alveolares residentes en el pulmón en forma directa, lo que induciría la liberación de TNF- α e IL-6 a partir de este subtipo celular. Estas citoquinas activarían en forma secundaria a los neutrófilos, y a otros macrófagos, favoreciendo la producción de más TNF- α e IL-6. Además, la acción de estas citoquinas sobre las células del epitelio respiratorio induciría la liberación de MCP-1, entre otros mediadores inflamatorios. La acción conjunta de estas citoquinas favorecería la infiltración de neutrófilos y monocitos en el tejido pulmonar, donde serían activados y contribuirían a la liberación de TNF- α e IL-6. De esta manera, los macrófagos residentes en el pulmón serían las células encargadas de orquestar la respuesta inflamatoria

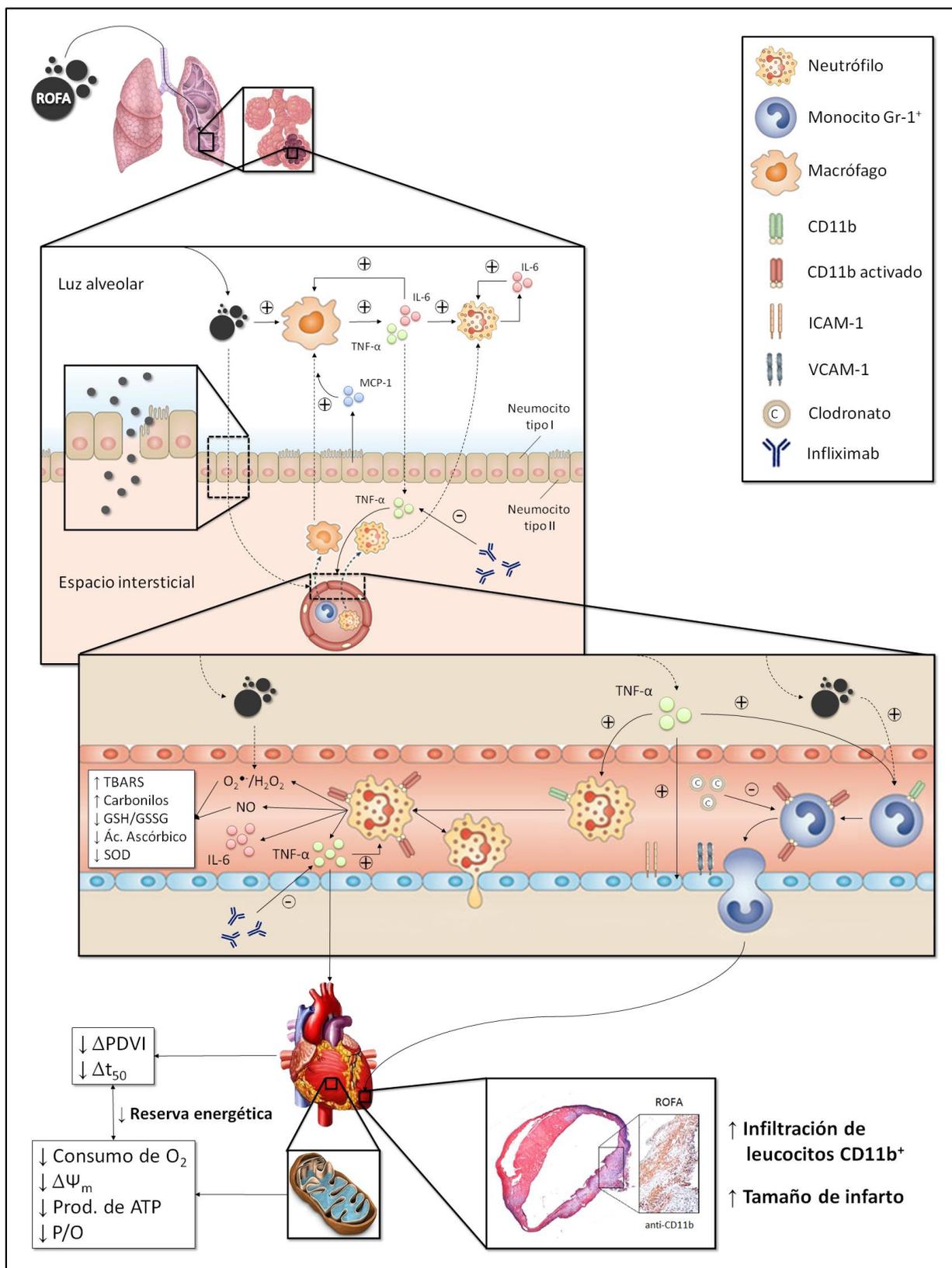


Figura 77. Secuencia de eventos a nivel local, sistémico y en tejido cardíaco promovidos por la inhalación de MP.

local luego de la exposición al MP, mientras que la infiltración de monocitos circulantes hacia el tejido pulmonar sería un mecanismo importante de amplificación de la misma, y de la progresión hacia una respuesta inflamatoria sistémica.

La extravasación de los leucocitos hacia el pulmón y corazón estaría favorecida por la activación intravascular de células mieloides y endoteliales. Dicho proceso podría explicarse por el aumento en el nivel de expresión y activación de CD11b en neutrófilos y monocitos, y de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio, y estaría mediado principalmente por el TNF- α . En este contexto, no debe descartarse un efecto directo de las partículas ROFA, o de alguno de sus constituyentes, en el proceso de activación de los monocitos. La activación intravascular de neutrófilos explicaría algunas de las observaciones encontradas a nivel plasmático, como la ocurrencia de estrés oxidativo y los altos niveles de TNF- α e IL-6 encontrados en los ratones expuestos al MP.

A nivel del tejido cardíaco, la exposición a ROFA induce alteraciones bioenergéticas y cambios en el metabolismo del O₂ que estarían relacionadas con la disminución observada en la reserva contráctil y diastólica. El TNF- α liberado desde el pulmón hacia circulación periférica sería el principal mediador de estos efectos. Finalmente, el estado proinflamatorio sistémico inducido por la exposición al MP parecería agravar el IAM, por un mayor reclutamiento de células inflamatorias a la zona afectada y aumento del tamaño del infarto.

De esta manera, la relevancia de este estudio radica en revelar los mecanismos a través de los cuales el pulmón y el corazón pueden desarrollar una respuesta integrada a una exposición aguda al MP, que se inicia por un daño tisular local, y que luego induce la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica con efectos perjudiciales sobre el sistema cardiovascular. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión del aumento de la morbilidad y la mortalidad asociados a la exposición a contaminantes ambientales.



Conclusión

- ✓ La exposición a la contaminación ambiental, especialmente al MP proveniente de fuentes antropogénicas, se encuentra asociada a incrementos en la morbilidad y mortalidad por diversas afecciones cardiovasculares entre las que se destacan el IAM. En este contexto, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, primero local y luego sistémica, parecerían encontrarse relacionados con los efectos adversos observados sobre la salud.
- ✓ La administración de MP por vía intranasal resultó una técnica eficaz para la evaluación de los efectos de la exposición al MP sobre el sistema cardiovascular. Debido a su composición química característica, ROFA representa un modelo de MP útil para evaluar la contribución de los metales de transición presentes en el MP como responsables de los efectos nocivos observados luego de su inhalación.
- ✓ Una exposición aguda a ROFA afecta el metabolismo del O₂ y energético cardíaco, a través de la inducción de alteraciones de la función mitocondrial. Éstas se caracterizan por una disminución del consumo de O₂ mitocondrial, disminución de la actividad del Complejo II de la cadena respiratoria, disminución del potencial de membrana mitocondrial, de la velocidad de producción de ATP y de la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa. En consecuencia, la exposición a ROFA produce una disminución de la reserva bioenergética en el corazón.
- ✓ La inhalación de ROFA produce una reducción de la reserva contráctil y diastólica cardíaca. Esta alteración de la función contráctil del corazón se encuentra asociada a los cambios en el metabolismo del O₂ cardíaco inducidos por ROFA.
- ✓ Una exposición aguda a ROFA induce la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación a nivel sistémico, caracterizado por aumentos en los marcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas del plasma, consumo de defensas antioxidantes de bajo peso molecular y enzimáticas y liberación de citoquinas proinflamatorias a nivel pulmonar y plasmático. La activación intravascular de leucocitos PMN desempeña un rol central en estas observaciones.
- ✓ Los macrófagos alveolares residentes en el pulmón son las células encargadas de orquestar la respuesta inflamatoria promovida por la exposición a ROFA. El TNF- α y la IL-6 liberados por ellos activan de forma secundaria a los neutrófilos, y a otros macrófagos, favoreciendo la producción de más mediadores proinflamatorios. La acción conjunta de estas citoquinas, junto con MCP-1, promueve la infiltración de neutrófilos y monocitos en el tejido pulmonar. En este modelo, la migración de los monocitos circulantes hacia el pulmón es un evento clave en amplificación de la reacción inflamatoria local y en la progresión hacia una respuesta inflamatoria sistémica.

- ✓ A nivel sistémico, la inhalación de ROFA induce la extravasación de leucocitos a través de la activación de células mieloides y endoteliales. El principal mediador de este proceso es el TNF- α presente en el plasma de los ratones expuestos a ROFA y, en menor medida, la IL-6. Además, la inhalación de ROFA contribuye a la activación de monocitos por un efecto directo o de alguno de sus constituyentes.
- ✓ La exposición a ROFA agrava las consecuencias del IAM, al promover una mayor infiltración de monocitos Gr-1⁺ a la zona afectada y un aumento en el tamaño del infarto.
- ✓ La inhibición *in vivo* de la respuesta inflamatoria sistémica dependiente de TNF- α previene las alteraciones observadas en el metabolismo del O₂ en el corazón, así como la disminución de la reserva contráctil y diastólica cardíaca inducida por una exposición aguda a ROFA.
- ✓ La relevancia de este trabajo de tesis radica en revelar los mecanismos a través de los cuales el pulmón y el corazón pueden desarrollar una respuesta integrada a una exposición aguda al MP, que se inicia por un daño tisular local, y que luego induce la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica con efectos perjudiciales sobre el sistema cardiovascular.
- ✓ Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de los mecanismos subyacentes en el aumento de la morbilidad y la mortalidad asociados a la exposición a contaminantes ambientales.

RESUMEN

En su último informe, la Organización Mundial de la Salud estima que unas 7 millones de personas por año mueren prematuramente a causa de los efectos perjudiciales de la contaminación ambiental, mayoritariamente por afecciones cardiovasculares. A pesar de la naturaleza compleja de la contaminación ambiental y de la coexistencia de numerosos compuestos con potenciales efectos perjudiciales sobre la salud, evidencia epidemiológica sustancial indica que el principal responsable es el material particulado (MP), especialmente aquél cuyo origen es antropogénico.

En este contexto, se ha sugerido que el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, primero local y luego sistémica, podrían encontrarse relacionados con los efectos adversos observados sobre el sistema cardiovascular. Sin embargo, no se conocen los mecanismos subyacentes a estas observaciones, así como de la cinética de la respuesta inflamatoria y del estrés oxidativo inducidos por una exposición aguda al MP. Tampoco se ha establecido el alcance que pueda tener esta respuesta inflamatoria sobre el sistema cardiovascular, ni su relación con la función cardíaca y con la incidencia y progresión de las principales enfermedades relacionadas con la exposición al MP, como el infarto agudo de miocardio (IAM).

Se ha sugerido que la presencia de metales de transición como constituyentes del MP amplifica la respuesta inflamatoria local, por inducción de daño oxidativo al tejido a través de reacciones tipo Fenton. Debido a su relevancia como contaminante ambiental y composición química particular (caracterizada por altas concentraciones de Fe, Ni y V en forma de sulfatos solubles, y bajo contenido de compuestos orgánicos) las partículas ROFA (Residual Oil Fly Ash) han sido especialmente útiles en la evaluación de esta hipótesis. Sin embargo, no se han estudiado en detalle sus efectos a nivel sistémico y sobre el sistema cardiovascular.

La hipótesis de la investigación planteada es que la exposición al MP induce alteraciones funcionales en el corazón, que estarían mediadas por un síndrome inflamatorio y estrés oxidativo, que se produce en primer lugar en el pulmón y luego se extiende a nivel sistémico, y cuyas consecuencias están asociadas a la aparición y progresión de las principales afecciones cardiovasculares reportadas en relación a la inhalación de MP.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el metabolismo oxidativo y energético cardíaco, y su relación con la función contráctil, luego de una exposición aguda a MP y utilizando distintos acercamientos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se plantea, además, estudiar la cinética de liberación de los principales mediadores prooxidantes y proinflamatorios involucrados en este contexto, así como los mecanismos inflamatorios activados en este proceso y sus alcances e implicancias sobre el sistema cardiovascular. Para ello, se utilizó un modelo de exposición aguda a MP en ratones realizada a través de una instilación intranasal de una suspensión de ROFA (1 mg/kg peso corporal), así como protocolos de exposición *in vitro* en distintos aislamientos y cultivos celulares.

En el Capítulo I se evaluó el metabolismo oxidativo y energético en corazón luego de la exposición a ROFA, particularmente en el análisis de la función mitocondrial, y su relación con la contractilidad cardíaca. La exposición aguda a ROFA disminuyó el consumo de O₂ en el corazón, con un mínimo a las 3 h luego del tratamiento. Esta situación se acompañó de una alteración de la función mitocondrial, caracterizada por una disminución del consumo de O₂, de la actividad del Complejo II de la cadena respiratoria, del potencial de membrana, de la velocidad de producción de ATP y de la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa. Asimismo, se observó una reducción de la reserva contráctil y diastólica cardíaca, la cual se encontró relacionada con la disminución del consumo de O₂ encontrada en el corazón de los ratones expuestos a ROFA.

En el Capítulo II se estudió la cinética de la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica luego de la exposición aguda a ROFA. Se encontró un aumento en los marcadores plasmáticos de daño oxidativo a macromoléculas (TBARS y carbonilos), junto con un descenso en los niveles de las defensas antioxidantes (relación GHS/GSSG, contenido de ácido ascórbico y actividad de SOD), cuyos efectos más marcados se observaron a las 3 h luego del tratamiento. Se encontró, además, un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias en pulmón y plasma (TNF- α e IL-6), junto con la activación intravascular de leucocitos PMN.

En el Capítulo III se analizaron los mecanismos de la respuesta inflamatoria local y sistémica inducida por la exposición aguda a ROFA, centrado especialmente en el rol de los monocitos y las consecuencias sobre la progresión del IAM. Los resultados obtenidos muestran que los macrófagos alveolares producen cantidades significativas de TNF- α y la IL-6, y que los neutrófilos contribuyen parcialmente a la producción de IL-6 a nivel local. Por otro lado, se observó una inducción de la extravasación de leucocitos en circulación periférica en los ratones expuestos a ROFA, junto con un incremento en los marcadores de activación de células mieloides y endoteliales. La depleción de monocitos en circulación periférica, previa a la administración de ROFA, previno la aparición de signos de inflamación local y sistémica inducida por la exposición al MP. Se observó, además, que la exposición a ROFA agrava las consecuencias del IAM, al promover una mayor infiltración de monocitos Gr-1⁺ a la zona afectada y un aumento en el tamaño del infarto.

En el Capítulo IV se evaluaron los mecanismos involucrados en la activación de células mieloides y endoteliales mediante estudios *in vitro*. Se observó que las partículas ROFA, o alguno de sus constituyentes, promueven la activación de macrófagos y monocitos de forma directa, pero no de neutrófilos y células endoteliales. Por otro lado, se encontró que el plasma de los ratones expuestos a ROFA promueve la activación de células mieloides y endoteliales. Utilizando anticuerpos bloqueantes dirigidos a distintas citoquinas proinflamatorias presentes en este plasma, se identificó al TNF- α como el principal responsable de este último efecto.

Finalmente, en el Capítulo V, se evaluó el efecto de la inhibición *in vivo* de la respuesta inflamatoria dependiente de TNF- α sobre las alteraciones en corazón inducidas por la exposición a

ROFA. Se observó que el tratamiento previo con un anticuerpo bloqueante anti-TNF- α (Infliximab) previene la disminución del consumo de O_2 y la reducción de la reserva contráctil y diastólica cardíaca en ratones inducida por la exposición aguda a ROFA. Además, el tratamiento con el anticuerpo recupera la correlación lineal positiva entre los cambios en el consumo de O_2 y la contractilidad cardíaca, la cual se había perdido en los ratones expuestos a ROFA.

La relevancia de este estudio radica en revelar los mecanismos a través de los cuales el pulmón y el corazón pueden desarrollar una respuesta integrada a una exposición aguda al MP, que se inicia por un daño tisular local, y que luego induce la ocurrencia de estrés oxidativo e inflamación sistémica con efectos perjudiciales sobre el sistema cardiovascular. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión del aumento de la morbilidad y la mortalidad asociados a la exposición a contaminantes ambientales.



Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. *Inmunología celular y Molecular*. Séptima edición. Elsevier, Barcelona, España, 2012.
- Analitis A, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Samoli E, Nikoloulopoulos AK, Petasakis Y, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Cambra K, Forastiere F, Zmirou D, Vonk JM, Clancy L, Kriz B, Bobvos J, Pekkanen J. Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. *Epidemiology*. 2006;17:230-3.
- Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol*. 2012;8(2):166-75.
- Beauchamp CO, Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta*. 1973;317(1):50-64.
- Becker S, Soukup JM, Gallagher JE. Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicol In Vitro*. 2002;16(3):209-18.
- Beelen R, Hoek G, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Fischer P, Schouten LJ, Jerrett M, Hughes E, Armstrong B, Brunekreef B. Long-term effects of traffic-related air pollution on mortality in a Dutch cohort (NLCS-AIR study). *Environ Health Perspect*. 2008;116(2):196-202.
- Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschütz W, Lipke C, Köstler H, von Kienlin M, Harre K, Hahn D, Neubauer S. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with ³¹P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(7):1267-74.
- Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*. 2001;109:389-94.
- Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1116-23.
- Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. En: *Oxygen, Gene Expression and Cellular Function* (Clerch Lb y Massaro DJ, Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, Estados Unidos, 1997.
- Boveris A, Costa LE, Cadenas E., Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by denosine diphosphate, oxygen and nitric oxide synthase. *Methods Enzymol*. 1999;301:188-98.
- Boveris A, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, Valdez L, Boveris AD, Navarro A. Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol*. 2002;359:328-39.
- Boveris DL, Boveris A. Oxygen delivery to tissues and mitochondrial respiration. *Front Biosci*. 2007;12:1014-23.
- Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):224-9.
- Boveris A, Repetto MG, Bustamante J, Boveris AD, Valdez LB. The concept of oxidative stress in pathology. En: *Free Radical Pathophysiology* (Alvarez S, Evelson P y Boveris A, Eds.). Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 1-17, 2008.
- Boveris A, Carreras MC, Poderoso JJ. The regulation of cell energetics and mitochondrial signaling by nitric oxide. En: *Nitric Oxide, Biology and Pathobiology* (Ignarro Lj, Ed.). Segunda edición. Academic press, New York, Estados Unidos, pp. 441-82, 2009.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435:297-312.
- Bräuner EV, Forchhammer L, Møller P, Simonsen J, Glasius M, Wåhlin P, Raaschou-Nielsen O, Loft S. Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress-induced DNA damage. *Environ Health Perspect*. 2007;115(8):1177-82.

- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109(21):2655-71.
- Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115(6):175-87.
- Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121:2331-78.
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002;360:1233-42.
- Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J Am Chem Soc*. 1981;103:6471-7.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.
- Calderón-Garcidueñas L, Villarreal-Calderon R, Valencia-Salazar G, Henríquez-Roldán C, Gutiérrez-Castrellón P, Torres-Jardón R, Osnaya-Brizuela N, Romero L, Torres-Jardón R, Solt A, Reed W. Systemic inflammation, endothelial dysfunction, and activation in clinically healthy children exposed to air pollutants. *Inhal Toxicol*. 2008;20(5):499-506.
- Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MC, Kodavanti UP, Evansky PA, Costa DL, Watkinson WP. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol Sci*. 2001;64(2):243-52.
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;146(2):180-8.
- Catz SD, Carreras MC, Poderoso JJ. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):741-8.
- CDC/NIH - Center for Disease Control and Prevention/National Institute of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. Cuarta edición. US Government Printing Office, Washington DC, Estados Unidos, 1999.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527-605.
- Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP. Investigation of the microcharacteristics of PM_{2.5} in residual oil fly ash by analytical transmission electron microscopy. *Environ Sci Technol*. 2004;38(24):6553-60.
- Chen LH, Knutsen SF, Shavlik D, Beeson WL, Petersen F, Ghamsary M, Abbey D. The association between fatal coronary heart disease and ambient particulate air pollution: Are females at greater risk? *Environ Health Perspect*. 2005;113(12):1723-9.
- Chen LC, Lippmann M. Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health. *Inhal Toxicol*. 2009;21:1-31.
- Chin, M. Basic mechanisms for adverse cardiovascular events associated with air pollution. *Heart*. 2015;101:253-6.
- Clancy L, Goodman P, Sinclair H, Dockery DW. Effects of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *Lancet*. 2002;360:1210-4.
- Costa DL, Dreher KL. Bioavailable Transition Metals in Particulate Matter Mediate Cardiopulmonary Injury in Healthy and Compromised Animal Models. *Environ Health Perspect*. 1997;105(5):1053-60.

- Costa DL, Lehmann JR, Winsett D, Richards J, Ledbetter AD, Dreher KL. Comparative pulmonary toxicological assessment of oil combustion particles following inhalation or instillation exposure. *Toxicol Sci.* 2006;91(1):237-46.
- Czerniczyniec A, Karadayian AG, Bustamante J, Cutrera RA, Lores-Arnaiz S. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1428-36.
- Dahl M, Bauer AK, Arredouani M, Soininen R, Tryggvason K, Kleeberger SR, Kobzik L. Protection against inhaled oxidants through scavenging of oxidized lipids by macrophage receptors MARCO and SR-A/II. *J Clin Invest.* 2007;117(3):757-64.
- Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PH, Tavares Duarte de Oliveira A, Rhoden CR. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicol Mech Methods.* 2012;22(7):533-9.
- Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect.* 2005;113(8):934-46.
- Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Polidori A, Arhami M, Gillen DL, Kleinman MT, Vaziri ND, Longhurst J, Zaldivar F, Sioutas C. Circulating biomarkers of inflammation, antioxidant activity, and platelet activation are associated with primary combustion aerosols in subjects with coronary artery disease. *Environ Health Perspect.* 2008;116(7):898-906.
- Delfino RJ, Staimer N, Vaziri ND. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. *Air Qual Atmos Health.* 2011;4(1):37-52.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.
- Di Pietro A, Visalli G, Baluce B, Micale RT, La Maestra S, Spataro P, De Flora S. Multigenerational mitochondrial alterations in pneumocytes exposed to oil fly ash metals. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(2):138-44.
- Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol.* 1993;120(2):545-56.
- Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* 1993;329:1753-9.
- Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA.* 2006;295:1127-34.
- Donato M, D'Annunzio V, Berg G, Gonzalez G, Schreier L, Morales C, Wikinski RL, Gelpi RJ. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K+(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;49(5):287-92.
- Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health.* 1997;50:285-305.
- Drew B, Leeuwenburgh C. Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285(5):R1259-67.
- Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci.* 2000;55(1):24-35.
- Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 2):H935-43.

- Eftim SE, Samet JM, Janes H, McDermott A, Dominici F. Fine particulate matter and mortality: a comparison of the Six Cities and American Cancer Society cohorts with a Medicare cohort. *Epidemiology*. 2008;19(2):209-16.
- Elsom DM. *Atmospheric Pollution: A Global Problem*. Segunda edición. Wiley-Blackwell, 1992.
- Enstrom JE. Fine particulate air pollution and total mortality among elderly Californians, 1973-2002. *Inhal Toxicol*. 2005;17(14):803-16.
- EPA - Environmental Protection Agency. *Integrated Science Assessment for Particulate Matter (Final Report)*. EPA, Washington DC, EPA/600/R-08/139F, 2009. Actualización 2012.
- Evelson P, González-Flecha B. Time course and quantitative analysis of the adaptive responses to 85% oxygen in the rat lung and heart. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1523(2-3):209-16.
- Evelson P, Tasat D, Alvarez S. Air pollution, inflammation and oxidative stress. En: *Free Radical Pathophysiology* (Alvarez S, Evelson P y Boveris A, Eds.). Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 237-54, 2008.
- Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113(4-5):234-58.
- Farraj AK, Hazari MS, Haykal-Coates N, Lamb C, Winsett DW, Ge Y, Ledbetter AD, Carll AP, Bruno M, Ghio A, Costa DL. ST depression, arrhythmia, vagal dominance, and reduced cardiac micro-RNA in particulate-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):185-96.
- Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(3):236-56.
- Filleul L, Rondeau V, Vandentorren S, Le Moual N, Cantagrel A, Annesi-Maesano I, Charpin D, Declercq C, Neukirch F, Paris C, Vervloet D, Brochard P, Tessier JF, Kauffmann F, Baldi I. Twenty five year mortality and air pollution: results from the French PAARC survey. *Occup Environ Med*. 2005;62(7):453-60.
- Flohé L, Gunzler A, Schock H. Glutathione peroxidase: a seleno-enzyme. *FEBS Lett*. 1973;32(1):132-4.
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*. 2007;2(2):287-95.
- Gavett SH, Madison SL, Dreher KL, Winsett DW, McGee JK, Costa DL. Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. *Environ Res*. 1997;72(2):162-72.
- Gehring U, Heinrich J, Krämer U, Grote V, Hochadel M, Sugiri D, Kraft M, Rauchfuss K, Eberwein HG, Wichmann HE. Long-term exposure to ambient air pollution and cardiopulmonary mortality in women. *Epidemiology*. 2006;17(5):545-51.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
- Ghelfi E, Rhoden CR, Wellenius GA, Lawrence J, Gonzalez-Flecha B. Cardiac oxidative stress and electrophysiological changes in rats exposed to concentrated ambient particles are mediated by TRP-dependent pulmonary reflexes. *Toxicol Sci*. 2008;102(2):328-36.
- Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):981-8.
- Ghio AJ, Devlin RB. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(4):704-8.
- Ghio AJ, Gilbey JG, Roggli VL, Richards JH, McGee JK, Carson JL, Devlin RB, Cascio WE. Diffuse alveolar damage after exposure to an oil fly ash. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1514-8.

- Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect.* 2002a;110:89-94.
- Ghio AJ, Suliman HB, Carter JD, Abushamaa AM, Folz RJ. Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002b;283:L211-8.
- Ghio AJ, Huang YC. Exposure to concentrated ambient particles (CAPs): a review. *Inhal Toxicol.* 2004;16(1):53-9.
- Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxidase synthase. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(4):397-408.
- Goldsmith CA, Frevert C, Imrich A, Sioutas C, Kobzik L. Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ Health Perspect.* 1997;105(5):1191-5.
- Goldsmith CA, Imrich A, Danaee H, Ning YY, Kobzik L. Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A.* 1998;54(7):529-45.
- Goodman PG, Dockery DW, Clancy L. Cause-specific mortality and the extended effects of particulate pollution and temperature exposure. *Environ Health Perspect.* 2004;112:179-85.
- Götz AA, Rozman J, Rödel HG, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Klingenspor M, Stoeger T. Comparison of particle-exposure triggered pulmonary and systemic inflammation in mice fed with three different diets. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:30.
- Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):553-61.
- Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, González-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect.* 2002;110(8):749-55.
- Haines TH, Dencher NA. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 2002;528(1-3):35-9.
- Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* 2001;353(2):411-6.
- Hauser R, Elreedy S, Hoppin JA, Christiani DC. Airway obstruction in boilermakers exposed to fuel oil ash. A prospective investigation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(5 Pt 1):1478-84.
- Hays MD, Beck L, Barfield P, Willis RD, Landis MS, Stevens RK. Physical and Chemical Characterization of Residual Oil-Fired Power Plant Emissions. *Energy & Fuels.* 2009;23:2544-51.
- Heinrich J, Pitz M, Bischof W, Krug N, Borm PJ. Endotoxin in fine (PM_{2.5}) and coarse (PM_{2.5-10}) particle mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis. *Atmos Environ.* 2003;37:3659-67.
- Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J Public Health.* 2001;91:553.
- Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr_{4a1} to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2014;114(10):1611-22.
- Hill BG, Dranka BP, Zou L, Chatham JC, Darley-USmar VM. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem J.* 2009;424(1):99-107.
- Hochachka PW. The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(22):12233-9.

- Hoek G, Brunekreef B, Fischer P, van Wijnen J. The association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study. *Epidemiology*. 2001;12:355-7.
- Hohensinner PJ, Niessner A, Huber K, Weyand CM, Wojta J. Inflammation and cardiac outcome. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(3):259-64.
- Huggins FE, Galbreath KC, Eylands KE, Van Loon LL, Olson JA, Zillioux EJ, Ward SG, Lynch PA, Chu P. Determination of nickel species in stack emissions from eight residual oil-fired utility steam-generating units. *Environ Sci Technol*. 2011;45(14):6188-95.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(24):9265-9.
- ILAR/NRC - Institute for Laboratory Animal Research/National Research Council. *Occupational Health and Safety in the Care and Use of Research Animals*. National Academy Press, Washington DC, Estados Unidos, 1997.
- Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):412-9.
- Ishii H, Fujii T, Hogg JC, Hayashi S, Mukae H, Vincent R, van Eeden SF. Contribution of IL-1 beta and TNF-alpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM₁₀). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(1):L176-83.
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ. *In vivo* evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol*. 1997;10:1104-8.
- Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Shah Z, Deiluiis JA, Xu X, Kherada N, Brook RD, Reddy KM, Padture NP, Parthasarathy S, Chen LC, Moffatt-Bruce S, Sun Q, Morawietz H, Rajagopalan S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ Res*. 2011;108(6):716-26.
- Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopoli Y, Rossi G, Zmirou D, Ballester F, Boumghar A, Anderson HR, Wojtyniak B, Paldy A, Braunstein R, Pekkanen J, Schindler C, Schwartz J. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 Project. *Epidemiology*. 2001;12:521-31.
- Kehrer J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43-50.
- Kido T, Tamagawa E, Bai N, Suda K, Yang HH, Li Y, Chiang G, Yatera K, Mukae H, Sin DD, van Eeden SF. Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):197-204.
- Killingsworth CK, Alessandrini F, Krishna Murty GC, Catalano PJ, Paulauskis JD, Godleski JJ. Inflammation, chemokine expression, and death in monocrotaline-treated rats following fuel coal ash inhalation. *Inhal Toxicol*. 1997;9:541-5.
- Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, Ghayeb J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*. 1993;30(16):1443-53.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(10):399-402.
- Knuckles TL, Stapleton PA, Minarchick VC, Esch L, McCawley M, Hendryx M, Nurkiewicz TR. Air pollution particulate matter collected from an Appalachian mountaintop mining site induces microvascular dysfunction. *Microcirculation*. 2013;20(2):158-69.
- Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*. 2008;13:2400-7.

- Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol.* 1995;155(1):367-76.
- Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Watkinson WP, Campen MJ, Winsett DW, Richards JR, Crissman KM, Hatch GE, Costa DL. The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease: evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164(3):250-63.
- Koppenol W. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep.* 2001;6(4):229-34.
- Krewski D, Burnett RT, Goldberg MS, Hoover K, Siemiatycki J, Abrahamowicz M, White WH. Validation of the Harvard Six Cities Study of particulate air pollution and mortality. *N Engl J Med.* 2004;350(2):198-9.
- Kutnink MA, Hawkes WC, Schaus EE, Omaye ST. An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. *Anal Biochem.* 1987;166(2):424-30.
- Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(6):667-72.
- Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Büttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* 2000;101(19):2264-70.
- Langrish JP, Mills NL, Chan JK, Leseman DL, Aitken RJ, Fokkens PH, Cassee FR, Li J, Donaldson K, Newby DE, Jiang L. Beneficial cardiovascular effects of reducing exposure to particulate air pollution with a simple facemask. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:8.
- Langrish JP, Watts SJ, Hunter AJ, Shah AS, Bosson JA, Unosson J, Barath S, Lundbäck M, Cassee FR, Donaldson K, Sandström T, Blomberg A, Newby DE, Mills NL. Controlled exposures to air pollutants and risk of cardiac arrhythmia. *Environ Health Perspect.* 2014;122:747-53.
- Last JA, Sun WM, Witschi H. Ozone, NO, and NO₂: oxidant air pollutants and more. *Environ Health Perspect.* 1994;102:179-84.
- Lauterbach M, O'Donnell P, Asano K, Mayadas TN. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *J Leukoc Biol.* 2008;83(6):1423-30.
- Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniadou C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem.* 2012;19(16):2504-20.
- Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, Azhayev A, Väänänen HK, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol.* 2002;61(5):1255-62.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1921-42.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Schacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003;111:455-60.
- Li R, Koua X, Geng H, Xie J, Tian J, Cai Z, Dong C. Mitochondrial damage: An important mechanism of ambient PM_{2.5} exposure-induced acute heart injury in rats. *J Hazard Mater* 2015;287:392-401.
- Link G, Saada A, Pinson A, Konijn AM, Hershko C. Mitochondrial respiratory enzymes are a major target of iron toxicity in rat heart cells. *J Lab Clin Med.* 1998;131(5):466-74.

- Liochev S. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst.* 1999;36:1-39.
- Lipfert FW, Baty JD, Miller JP, Wyzga RE. PM_{2.5} constituents and related air quality variables as predictors of survival in a cohort of U.S. military veterans. *Inhal Toxicol.* 2006;18(9):645-57.
- Lipsett MJ. Oxides of nitrogen and sulfur. En: *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures* (Sullivan JB y Krieger GR, Eds.). Segunda edición. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Estados Unidos, pp. 818-28, 2001.
- Logan WP. Mortality in the London fog incident, 1952. *Lancet.* 1953;1:336-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhailil L, Fruchart JC, Ducimetiere P. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):169-76.
- Magnani ND, Marchini T, Tasat DR, Alvarez S, Evelson PA. Lung oxidative metabolism after exposure to ambient particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(4):667-72.
- Magnani ND, Marchini T, Vanasco V, Tasat DR, Alvarez S, Evelson P. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction in lung after an acute exposure to residual oil fly ashes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;270(1):31-8.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):519-31.
- Mariappan N, Elks CM, Fink B, Francis J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(4):462-70.
- Martin S, Fernandez-Alanis E, Delfosse V, Evelson P, Yakisich JS, Saldiva PH, Tasat DR. Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs. *Inhal Toxicol.* 2010;22(13):1064-71.
- Martinelli N, Olivieri O, Girelli D. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review. *Eur J Int Med.* 2013;24(4): 295-302.
- Masters BS. Structural variations to accommodate functional themes of the isoforms of NOS. En: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro LJ, Ed.). Primera edición. Academic press, New York, Estados Unidos, pp. 91-104, 2000.
- McDonnell WF, Nishino-Ishikawa N, Petersen FF, Chen LH, Abbey DE. Relationships of mortality with the fine and coarse fractions of long-term ambient PM₁₀ concentrations in nonsmokers. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2000;10(5):427-36.
- Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, Kaufman JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med.* 2007;356(5):447-58.
- Miller M, Shaw CA, Langrish JP. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol.* 2012;8(4):577-602.
- Miller M. The role of oxidative stress in the cardiovascular actions of particulate air pollution. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):1006-11.
- Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandstrom T, Blomberg A, Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6:36-44.
- Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.

- Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;257(2):209-26.
- Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, Vesterdal LK, Forchhammer L, Wallin H, Loft S. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic Res*. 2010;44(1):1-46.
- Mudway IS, Stenfors N, Duggan ST, Roxborough H, Zielinski H, Marklund SL, Blomberg A, Frew AJ, Sandström T, Kelly FJ. An *in vitro* and *in vivo* investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 2004;423(1):200-12.
- Naess Ø, Nafstad P, Aamodt G, Claussen B, Rosland P. Relation between concentration of air pollution and cause-specific mortality: four-year exposures to nitrogen dioxide and particulate matter pollutants in 470 neighborhoods in Oslo, Norway. *Am J Epidemiol*. 2007;165(4):435-43.
- Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, Yamamoto M, Miyaji K, Saito H, Morita H, Emori T, Matsubara H, Toyokuni S, Ohe T. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*. 2002;105(24):2867-71.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-47.
- Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45.
- Nel A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science*. 2005;308:804-6.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311:622-7.
- Nelson D, Cox M. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. Cuarta edición. Ediciones Omega, Barcelona, España, 2006.
- Nemery B, Hoet P, Nemmar, A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet*. 2001;357:704-8.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002;105:411-4.
- Neubauer S. The failing heart-an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356(11):1140-51.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics*. Tercera edición. Academic Press, San Diego, Estados Unidos, 2002.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Castranova V, Boegehold MA. Particulate matter exposure impairs systemic microvascular endothelium-dependent dilation. *Environ Health Perspect*. 2004;112(13):1299-306.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Millecchia L, Rao KM, Marvar PJ, Hubbs AF, Castranova V, Boegehold MA. Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure. *Environ Health Perspect*. 2006;114(3):412-9.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113:823-39.
- OMS - Organización Mundial de la Salud. *Burden of disease from the joint effects of Household and Ambient Air Pollution for 2012*. Public Health, Social and Environmental Determinants of Health Department, World Health Organization. Ginebra, Suiza, 2014.
- Ostachuk A, Evelson P, Martin S, Dawidowski L, Sebastián Yakisich J, Tasat DR. Age-related lung cell response to urban Buenos Aires air particle soluble fraction. *Environ Res*. 2008;107(2):170-7.

- Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*. 1979;278(5706):737-8.
- Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C^{hi} monocytosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(15):1629-38.
- Pattanaik S, Huggins FE, Huffman GP. Chemical speciation of Fe and Ni in residual oil fly ash fine particulate matter using X-ray absorption spectroscopy. *Environ Sci Technol*. 2012;46(23):12927-35.
- Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2810-5.
- Petersen SV, Thøgersen IB, Valnickova Z, Nielsen MS, Petersen JS, Poulsen ET, Jacobsen C, Oury TD, Moestrup SK, Crapo JD, Nielsen NC, Kristensen T, Enghild JJ. The concentration of extracellular superoxide dismutase in plasma is maintained by LRP-mediated endocytosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(5):894-9.
- Poderoso J, Fernandez S, Carreras MC, Tchercanski D, Acevedo C, Rubio M, Peralta J, Boveris A. Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats. *Circ Shock*. 1994;44:175-82.
- Polichetti G, Cocco S, Spinali A, Trimarco V, Nunziata A. Effects of particulate matter (PM₁₀, PM_{2.5} and PM₁) on the cardiovascular system. *Toxicology*. 2009;261(1-2):1-8.
- Pope CA 3rd. Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health*. 1989;79(5):623-8.
- Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:669-74.
- Pope CA 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect*. 2000;108:713-23.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287:1132-41.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004;109:71-7.
- Pope CA 3rd, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horne BD. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation*. 2006;114(23):2443-8.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Krewski D, Jerrett M, Shi Y, Calle EE, Thun MJ. Cardiovascular mortality and exposure to airborne fine particulate matter and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationship. *Circulation*. 2009;120:941-8.
- Puett RC, Schwartz J, Hart JE, Yanosky JD, Speizer FE, Suh H, Paciorek CJ, Neas LM, Laden F. Chronic particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the nurses' health study. *Am J Epidemiol*. 2008;168(10):1161-8.
- Radi R, Denicola A, Álvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H. The biological chemistry of peroxynitrite. En: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro LJ, Ed.). Primera edición. Academic Press, New York, Estados Unidos, pp. 57-82, 2000.
- Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26464-72.
- Rauba JA, Mathieu-Nolf M, Hampsonc NB, Thomd SR. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. *Toxicology*. 2000;145:1-14.

- Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1725(3):305-13.
- Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*. 2000;23(5):209-16.
- Riediker M. Cardiovascular effects of fine particulate matter components in highway patrol officers. *Inhal Toxicol*. 2007;19:99-105.
- Rodriguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994;656(2):311-8.
- Rossner P Jr, Svecova V, Milcova A, Lnenickova Z, Solansky I, Santella RM, Sram RJ. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat Res*. 2007;617(1-2):23-32.
- Samet JM, Silbajoris R, Huang T, Jaspers I. Transcription factor activation following exposure of an intact lung preparation to metallic particulate matter. *Environ Health Perspect*. 2002;110(10):985-90.
- Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-Usmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells: the importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chem Biol Interact*. 2011;191(1-3):288-95.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81
- Sarti P, Forte E, Mastronicola D, Giuffrè A, Arese M. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(4):610-9.
- Sato H, Onose J, Toyoda H, Toida T, Imanari T, Sagai M, Nishimura N, Aoki Y. Quantitative changes in glycosaminoglycans in the lungs of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicology*. 2001;166(3):119-28.
- Schlesinger RB. Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans: a review. *J Toxicol Environ Health*. 1985;15(2):197-214.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.
- Schroeder WH, Dobson M, Kane DM, Johnson ND. Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review. *J Air Pollut Control Assoc*. 1987;37:1267-85.
- Schwartz J. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ Res*. 1994;64:36-52.
- Segal BH, Kuhns DB, Ding L, Gallin JI, Holland SM. Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47(phox): complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 2002;71(3):410-6.
- Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:180-210.
- Shen W, Asai K, Uechi M, Mathier MA, Shannon RP, Vatner SF, Ingwall JS. Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation*. 1999;100(20):2113-8.
- Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, Squibb KA, Medvedev AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009;86(2):303-12.

- Sicari R, Nihoyannopoulos P, Evangelista A, Kasprzak J, Lancellotti P, Poldermans D, Voigt JU, Zamorano JL. Stress echocardiography expert consensus statement: European Association of Echocardiography (EAE) (a registered branch of the ESC). *Eur J Echocardiogr*. 2008;9(4):415-37.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative Stress* (Sies H, Ed.). Academic Press, San Diego, Estados Unidos, 1985.
- Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(9):719-26.
- Sørensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, Loft S. Personal PM_{2.5} exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect*. 2003;111(2):161-6.
- Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anaesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(4):L833-9.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991;266(15):9912-8.
- Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6(2):235-43.
- Stringer B, Kobzik L. Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress. *J Toxicol Environ Health A*. 1998;55(1):31-44.
- Sumen C, Mempel TR, Mazo IB, von Andrian UH. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity*. 2004;21(3):315-29.
- Sunyer J, Atkinson R, Ballester F, LeTertre A, Ayers JG, Forastiere F, Forsberg B, Vonk JM, Bisanti L, Anderson RH, Schwartz J, Katsouyanni K. Respiratory effects of sulphur dioxide: a hierarchical multicity analysis in the APHEA 2 study. *Occup Environ Med*. 2003;60(8):e2.
- Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, Hearse DJ. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(11):867-78.
- Tao F, González Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(4):327-40.
- Tiscornia A, Cairoli E, Marquez M, Denicola A, Pritsch O, Cayota A. Use of diaminofluoresceins to detect and measure nitric oxide in low level generating human immune cells. *J Immunol Methods*. 2009;342(1-2):49-57.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008;117(2):244-79.
- Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K, Komukai K, Kataiwa H, Nakamura N, Hirata K, Tanaka A, Akasaka T. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(2):130-8.
- Turrens J, Boveris A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1980;191(2):421-7.
- Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, Kamp DW. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(2):180-7.
- van Donkelaar A, Martin RV, Brauer M, Kahn R, Levy R, Verduzco C, Villeneuve PJ. Global estimates of ambient fine particulate matter concentrations from satellite-based aerosol optical depth: development and application. *Environ Health Perspect*. 2010;118(6):847-55.

- van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):826-30.
- van Eeden SF, Yeung A, Quinlam K, Hogg JC. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):61-7.
- van Rooijen N, Hendriks E. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol Biol*. 2010;605:189-203.
- Vanasco V, Cimolai MC, Evelson P, Alvarez S. The oxidative stress and the mitochondrial dysfunction caused by endotoxemia are prevented by α -lipoic acid. *Free Radic Res*. 2008;42(9):815-23.
- Vivez-Bauza C, Yang L, Manfredi G. Assay of Mitochondrial ATP Synthesis in animal cells and tissues. En: *Methods in Cell Biology: Mitochondria* (Pon LA y Schon EA, Eds.). Academic Press, San Diego, Estados Unidos, pp. 155-71, 2007.
- Wallenborn JG, McGee JK, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Kodavanti UP. Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. *Toxicol Sci*. 2007;98(1):231-9.
- Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*. 2003;331(1-2):103-10.
- Watkinson WP, Campen MJ, Costa DL. Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol Sci*. 1998;41(2):209-16.
- Wellenius GA, Saldiva PH, Batalha JR, Krishna Murthy GG, Coull BA, Verrier RL, Godleski JJ. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci*. 2002;66(2):327-35.
- Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(4):333-49.
- Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 1994;314(2):284-90.
- Wolf D, Hohmann JD, Wiedemann A, Bledzka K, Blankenbach H, Marchini T, Gutte K, Zeschky K, Bassler N, Hoppe N, Rodriguez AO, Herr N, Hilgendorf I, Stachon P, Willecke F, Duerschmied D, von zur Muhlen C, Soloviev DA, Zhang L, Bode C, Plow EF, Libby P, Peter K, Zirlik A. Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice. *Circ Res*. 2011;109(11):1269-79.
- Wolf D, Jehle F, Michel NA, Bukosza EN, Rivera J, Chen YC, Hoppe N, Dufner B, Rodriguez AO, Colberg C, Nieto L, Rupprecht B, Wiedemann A, Schulte L, Peikert A, Bassler N, Lozhkin A, Hergeth SP, Stachon P, Hilgendorf I, Willecke F, von Zur Mühlen C, von Elverfeldt D, Binder CJ, Aichele P, Varo N, Febbraio MA, Libby P, Bode C, Peter K, Zirlik A. Coinhibitory suppression of T cell activation by CD40 protects against obesity and adipose tissue inflammation in mice. *Circulation*. 2014;129(23):2414-25.
- Xia T, Kovochich M, Nel AE. Impairment of mitochondrial function by particulate matter (PM) and their toxic components: implications for PM-induced cardiovascular and lung disease. *Front Biosci*. 2007;12:1238-46.
- Xia T, Li N, Nel A. Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health*. 2009;30:137-50.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 1976;15:212-6.
- Yang W, Omaye, ST. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutat Res*. 2009;674:45-54.
- Yonetani T. Cytochrome oxidase: beef heart. *Methods Enzymol*. 1967;10:332-5.

- Zanobetti A, Schwartz J. Particulate air pollution, progression, and survival after myocardial infarction. *Environ Health Perspect.* 2007;115(5):769-75.
- Zasłona Z, Przybranowski S, Wilke C, van Rooijen N, Teitz-Tennenbaum S, Osterholzer JJ, Wilkinson JE, Moore BB, Peters-Golden M. Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J Immunol.* 2014;193(8):4245-53.
- Zeger SL, Dominici F, McDermott A, Samet J. Mortality in the Medicare population and chronic exposure to fine particulate air pollution in urban centers (2000-2005). *Environ Health Perspect.* 2008;116(12):1614-9.