

Presencia de estrés oxidativo en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducido con exposición a humo de leña en cobayos

MARTHA MONTAÑO RAMÍREZ*
 JOSÉ CISNEROS LIRA*
 JOSÉ PEDRAZA-CHAVERRI†
 CARINA BECERRIL BERROCAL*
 CRISELDA MENDOZA MILLA*
 CARLOS RAMOS ABRAHAM* ☐

* Departamento de Investigación en Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

† Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

Trabajo recibido: 20-XI-2009; aceptado: 24-V-2010

Conflictos de intereses: ninguno

272

RESUMEN

Introducción: La exposición doméstica al humo de biomasa (principalmente leña) representa la segunda causa de EPOC. Alrededor del 45% de la población mundial utiliza combustibles de biomasa sólida y en México,

Palabras clave: Biomasa, enfisema, EPOC, malondialdehído, estrés oxidativo, superóxido dismutasa, humo de leña.

Key words: Biomass, emphysema, COPD, malondialdehyde, oxidative stress, superoxide dismutase, wood smoke.

Reportó el estado del estrés oxidativo ni el de enzimas antioxidantes.

Objetivo: Analizar la concentración plasmática de malondialdehído (MDA) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en macrófagos del lavado bronquioalveolar en cobayos expuestos al humo producido por 60 g de leña/día durante 7 meses.

ABSTRACT

Introduction: Domestic exposure to biomass smoke (mainly wood) represents the second cause of COPD. About 45% of the world's population use solid biomass fuels, and 69% of Mexican households at rural and marginalized urban areas use wood as primary fuel. Pathogenetic mechanisms in biomass smoke-associated COPD are only partially known. Recently, a COPD model was developed at INER by exposing guinea pigs to wood smoke. This model showed enhanced expression and activity of elastolytic, collagenolytic and gelatinolytic enzymes, pulmonary hypertension, smooth muscle hyperplasia, and apoptosis after. However, the status of oxidative stress or antioxidant enzymes was not reported.

Objective: To analyze plasma concentration of malondialdehyde (MDA) and activity of SOD in bronchoalveolar lavage (BAL) macrophages in guinea pigs daily exposed to the smoke produced by 60 g of wood/day during 7 months wood during 7 months.

Methods: MDA was measured by the 1-methyl-2-phenylindole reaction and SOD activity with a commercial Kit.

Results: MDA content increased after wood smoke exposure. Thus, while control groups had $\sim 0.459 \pm 0.051$ nmol/mL MDA, experimental groups reached 2.626 ± 0.310 , 1.707 ± 0.202 , and 1.354

Método: El MDA se midió con la reacción del 1-metil-2-fenilindol y la actividad de SOD con un paquete comercial.

Resultados: El contenido de MDA se incrementó por la exposición al humo de leña. Así, mientras que los grupos control tuvieron valores de $\sim 0.459 \pm 0.051$ nmol/mL de MDA, los grupos experimentales alcanzaron 2.626 ± 0.310 , 1.707 ± 0.202 y 1.354 ± 0.109 nmol/mL a los 3, 5 y 7 meses de exposición, respectivamente ($p < 0.001$ en todas las comparaciones). La actividad de la SOD también se incrementó, cambiando de $\sim 0.016 \pm 0.002$ unidades/ 10^6 macrófagos del LBA en los grupos control, hasta 0.071 ± 0.006 , 1.121 ± 0.049 y 0.276 ± 0.033 unidades/ 10^6 macrófagos del LBA a los 3, 5 y 7 meses respectivamente ($p < 0.001$ en todas las comparaciones).

Conclusión: Los hallazgos sugieren la participación del estrés oxidativo en la EPOC inducida por la exposición al humo de leña en cobayos.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la limitación irreversible del flujo aéreo debido a inflamación de las vías aéreas, acompañada de un deterioro progresivo en el estado general de la salud de los pacientes. Dicha limitación del flujo aéreo es progresiva e irreversible, asociándose a una respuesta inflamatoria anormal seguida de la destrucción del parénquima pulmonar, vías aéreas pequeñas y arterias pulmonares.^{1,2} La EPOC se asocia a la inhalación de diversas partículas nocivas contenidas en gases, vapores, polvos y humo del tabaco, entre otros, siendo el humo del tabaco su principal agente etiológico.³ La EPOC se constituye por diferentes entidades patogénicas incluyendo el enfisema, la bronquitis crónica y alteraciones de las vías aéreas pequeñas (bronquiolitis), así como un compromiso vascular que origina hipertensión arterial pulmonar.^{1,2}

En el proceso inflamatorio de la EPOC participan diferentes células, mediadores inflamatorios, quimioatrayentes, factores de crecimiento, moléculas de la matriz extracelular (MEC) y enzimas que actúan remodelando y, en su caso, degradando los diferentes componentes de la MEC; de igual forma, dentro del balance remodelativo de la MEC se involucran diversos inhibidores de las metaloproteínasas (MMPs) y otras proteínas, tales como los inhibidores tisulares de las

± 0.109 nmol/mL at 3, 5 and 7 months of exposure, respectively ($p < 0.001$ at all comparisons). SOD activity was also increased, changing from $\sim 0.016 \pm 0.002$ units/ 10^6 BAL macrophages in control groups to 0.071 ± 0.006 , 1.121 ± 0.049 , and 0.276 ± 0.033 units/ 10^6 BAL macrophages at 3, 5 and 7 months, respectively ($p < 0.001$ at all comparisons).

Conclusion: Our findings suggest that oxidative stress plays a role in wood smoke-induced COPD in guinea pigs.

273

metaloproteínasas (TIMPs) y la $\alpha 1$ -antitripsina ($\alpha 1$ -AT).^{4,5}

Los macrófagos y neutrófilos son las principales células que participan durante la etapa inflamatoria, remodelativa y degradativa de la MEC que ocurre en la patogenia de la EPOC, secretando MMPs, proteínas e inhibidores de proteínas.^{3,5,6}

Otro componente crucial en la patogenia de la EPOC es el estrés oxidativo, el cual surge del incremento en las concentraciones de moléculas oxidantes, tales como los radicales libres del oxígeno, en relación con los niveles de las moléculas que se encargan de eliminarlos, mejor conocidos como antioxidantes; este fenómeno se exacerba, además, por la misma presencia de los macrófagos y neutrófilos que poseen la capacidad de producir radicales libres y sustancias oxidativas.^{7,8} Los radicales libres modifican las propiedades físico-químicas y funcionales de diversas biomoléculas que se alteran durante la patogenia de la EPOC, pero no solamente a nivel del aparato respiratorio, sino que ocurren consecuencias en otros órganos, por lo que se ha propuesto que la EPOC se comporta como una enfermedad de naturaleza sistémica.^{9,10} Cabe mencionar que entre las moléculas oxidantes más dañinas se encuentran los radicales libres derivados del oxígeno, que incluyen al superóxido ($\cdot\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo (OH^-); mientras que el sistema para eliminarlos comprende enzi-

mas como la superóxido dismutasa, catalasa y diversas peroxidasas. La caracterización de la presencia del estrés oxidativo consiste en valorar las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno, así como su efecto en determinadas biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA; mientras que el efecto antioxidativo se relaciona con la expresión y actividad de enzimas antioxidantes y moléculas de los sistemas antioxidantes como el glutatión reducido.¹¹

La valoración del malondialdehído (MDA) es utilizada como un marcador bioquímico de la peroxidación lipídica, mientras que la nitratación de residuos de tirosina es utilizado para indicar la oxidación de proteínas en diferentes sistemas moleculares, celulares y tisulares.¹² Por otra parte, la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas constituye parte del estatus general antioxidativo.¹¹⁻¹³

En relación con los agentes etiológicos de la EPOC, es importante mencionar que recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó a la exposición a humos derivados de la combustión de biomasa sólida, principalmente leña, como la segunda causa de EPOC, en especial en países en vías de desarrollo como México.^{13,14} El humo de leña se utiliza domésticamente como combustible primario para la preparación de alimentos y como calefactor, con lo que se incrementa la tasa de morbilidad y mortalidad en la EPOC y otras enfermedades crónico-degenerativas.¹³⁻¹⁵ Las estadísticas de la OMS muestran que aproximadamente 3 mil millones de personas (~45% de la población mundial) utilizan leña y otras formas de biomasa sólida, lo que desafortunadamente va en vertiginoso aumento paralelo al incremento en la pobreza a nivel mundial. En México, la leña (preferente a otras formas de biomasa sólida) es utilizada como el combustible doméstico primario en 69% de los hogares en el medio rural, lo cual es alarmante;¹⁴⁻¹⁶ adicionalmente, cabe mencionar que los efectos del humo de leña van más allá de la inducción de la EPOC. En nuestro país, en un estudio recién publicado se analizó a mujeres expuestas al humo de leña que presentaban cáncer de pulmón, no obstante de que ninguna de ellas fumó tabaco. Estas pacientes vivían en áreas rurales o

zonas urbanas marginadas bajo pobreza extrema y su exposición al humo de leña fue de manera sostenida por períodos mayores de 10 años. Este estudio demostró una conexión entre la exposición al humo de leña y el desarrollo de cáncer pulmonar no relacionado a tabaco, además, de que la EPOC es una enfermedad sistémica.¹⁷

En relación con los mecanismos moleculares implicados en el inicio y progresión de la EPOC, asociada a la exposición del humo de leña, cabe destacar que éstos se conocen parcialmente a consecuencia de que en los pacientes, el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad.¹⁸⁻²⁰ En este sentido, no se conocen con precisión los eventos patogénicos iniciales ni los que se suceden durante su progresión. Una de las herramientas que ha sido de gran utilidad para obtener más información son los modelos animales, tales como los producidos por exposición al humo del tabaco, que han aportado diferentes datos y evidencias significativos para el esclarecimiento de aspectos diagnósticos, pronósticos, terapéuticos y preventivos cuando éstos han sido extrapolados al humano.²⁰⁻²²

Hasta ahora, los modelos animales que se han desarrollado para simular la EPOC asociada a exposición al humo de leña son de naturaleza aguda y subaguda.^{21,22} Recientemente en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) se desarrolló un modelo crónico de EPOC en cobayos, inducido con la exposición al humo producido por la combustión de 60 g de leña (madera de pino) por día durante 7 meses.²³ En este modelo se encontraron alteraciones histológicas en las vías aéreas, parénquima pulmonar y sistema vascular pulmonar, consistentes en la presencia de enfisema, hipertensión arterial pulmonar e hiperplasia del músculo liso, en paralelo al análisis de la expresión génica y actividad enzimática que mostró incremento en las metaloproteínasas MMP-1, MMP-2, y MMP-9 concomitante a la presencia de muerte celular por apoptosis. Todo lo anterior ocurrió después de 3 a 7 meses de exposición al humo de leña; y con ello, se lograron simular las características morfológicas y bioquímicas que ocurren en la EPOC observada en el humano, así como en modelos experimentales inducidos con humo de tabaco y otros agentes.^{21,22}

En el modelo de EPOC citado previamente²³ no se describieron los aspectos concernientes al estrés oxidativo, que es otro componente patogénico descrito en la EPOC. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consistió en analizar la participación del estrés oxidativo, valorando la concentración plasmática de MDA y la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa en macrófagos del lavado bronquioalveolar (LBA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tres grupos de 6 cobayos hembra de 2 meses de edad (peso de 350-400 g) colocados dentro de una cámara de exposición de acrílico (60 x 40 x 30 cm; largo, ancho, alto) fueron expuestos al humo circulante producido por la combustión de 60 g de leña (madera de pino) durante 3 horas/día, 5 días/semana, durante 7 meses. La concentración de monóxido de carbono (CO) dentro de la cámara de exposición fue controlada mediante un detector de CO (Responder MiniCO, Mine Safety Appliances Co. PA, USA), de manera que este gas no excediera de 80 ppm durante la exposición. Los grupos control para cada tiempo de estudio integrados por 6 cobayos cada uno, fueron expuestos bajo las mismas condiciones y períodos indicados al aire ambiente circulante.

Los cobayos fueron sacrificados a los 3, 5 y 7 meses de exposición. Se realizaron dos LBA con 8 mL de NaCl 0.9% estéril a 37°C, se extrajeron los pulmones en bloque y fueron congelados hasta su estudio.²³

Obtención del plasma

Se colectó sangre periférica de todos los animales en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante, posteriormente se obtuvo el plasma mediante centrifugación a 5,000 g, a 4°C por 10 min, extrayendo el sobrenadante plasmático y almacenándolo a -20 °C hasta su utilización.

Determinación de MDA

La concentración del MDA se valoró en el plasma mediante la reacción del 1-metil-2-fenilindol (1M2P) como describe Gérard-Monnier et ál.²⁴ Brevemente, alícuotas de 10 μ L de plasma fueron

mezcladas con 0.65 mL de una solución de 1M2P (15.4 mM disuelto en acetonitrilo/metanol 3:1). Estas muestras se mezclaron con 0.35 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4; las muestras se incubaron a 45°C por 40 min y fueron centrifugadas a 3,000 g durante 5 min. Se determinó la absorbancia del color desarrollado a 586 nm con un espectrofotómetro (DU640; Beckman Coulter, Fullerton, CA). La concentración de MDA se expresó como nmol/mL utilizando una curva estándar de MDA desarrollada de manera simultánea a las muestras problema.

Ensayo de SOD extracelular

La actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) extracelular (EC 1.15.1.1) se valoró mediante un paquete comercial de acuerdo con las especificaciones del fabricante (SOD assay kit #706002; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Brevemente descrito, en este análisis se utilizaron alícuotas de 10 μ L de extractos de 1×10^6 macrófagos, las cuales se trataron con 190 μ L de una solución de tetrazolio. La reacción se inició con la adición de 20 μ L de una solución de xantina oxidasa, seguida de la incubación durante 20 min a temperatura ambiental. Se registró el cambio en absorbancia mediante lectura a 450 nm utilizando una microplaca para lectura. La actividad de la SOD se expresó como unidades/ 10^6 macrófagos del LBA, calculándola mediante una curva estándar elaborada junto con las muestras problema. La actividad de la SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para el 50% de dismutación del radical superóxido.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar en por lo menos tres determinaciones independientes. Las comparaciones estadísticas se desarrollaron con la prueba t de Student, con el programa InerSTAT-a v2.0. Las comparaciones con una $p < 0.05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

La determinación de las concentraciones plasmáticas del MDA se muestran en la Figura 1, la

concentración de este marcador de la peroxidación lipídica se incrementó significativamente a los 3, 5 y 7 meses de la exposición al humo de leña; en los grupos control de los diferentes tiempos de estudio se encontraron valores promedio semejantes de aproximadamente 0.459 ± 0.051 nmol/mL, los cuales se incrementaron hasta 2.626 ± 0.310 , 1.707 ± 0.202 , 1.354 ± 0.109 nmol/mL a los 3, 5 y 7 meses, respectivamente, en los animales que fueron sometidos a la exposición del humo de leña ($p < 0.001$; prueba t de Student).

La actividad de la SOD en macrófagos del LBA se modificó de manera similar al MDA, aumentando significativamente desde los 3 hasta los 7 meses de exposición, mostrando valores semejantes en los controles de alrededor de 0.016 ± 0.002 unidades/ 10^6 macrófagos del LBA, y aumentando hasta 0.071 ± 0.006 , 1.121 ± 0.049 , y 0.276 ± 0.033 unidades/ 10^6 macrófagos del LBA en los cobayos expuestos al humo de leña por 3, 5 y 7 meses, respectivamente ($p < 0.001$; prueba t de Student).

DISCUSIÓN

La principal causa de la EPOC es la inhalación de humo de tabaco, que ha sido bien caracterizada. La segunda causa reconocida es la exposición al producto de combustión de diversas formas de biomasa sólida, especialmente la exposición doméstica al humo de leña, por su asequibilidad ecológica. La importancia de esta segunda causa de EPOC radica en el hecho de que las estadísticas muestran que aproximadamente el 45% de la población mundial utiliza leña y otras formas sólidas de biomasa.^{1,14} Por otra parte, se ha determinado que en el 69% de los hogares mexicanos de áreas rurales y zonas urbanas marginadas se utiliza leña como energético primario, en asociación con la pobreza extrema, la que desafortunadamente va en vertiginoso aumento global.¹⁴⁻¹⁶ Los mecanismos involucrados en el inicio y progreso de la EPOC asociada a la exposición al humo de leña se conocen sólo de forma parcial, debido a que los pacientes (en su mayoría mujeres) acuden a consulta en etapas avanzadas de la enfermedad. En este sentido, los modelos animales representan

una alternativa muy útil en la investigación de los mecanismos iniciales y progresivos en la patogenia de esta forma de EPOC.

Los hallazgos del presente estudio, desarrollado mediante la exposición de cobayos al humo de leña, consisten en el incremento de los niveles plasmáticos de MDA (Figura 1), así como el aumento en la actividad de la enzima antioxidante SOD en los macrófagos del LBA (Figura 2), ocurriendo ambos incrementos después de tres a siete meses de exposición al humo de leña. Estos incrementos son semejantes a los causados por el humo de cigarrillo cuando produce EPOC, tanto en humanos⁸ como en diversos modelos animales,²¹ en los que se ha visto que uno de los componentes patogénicos de la EPOC es el estrés oxidativo.¹⁻⁴ Por otra parte, el hecho de haber encontrado en este modelo de exposición al humo de leña incrementos significativos en la concentración del MDA plasmático, así como en la actividad de la SOD en macrófagos del LBA, nos muestra que en esta forma de EPOC se presentan, tanto mecanismos fisiopatológicos oxidativos sistémicos como mecanismos antioxidativos protectores que están operando a nivel pulmonar. Recientemente se ha comenzado a considerar a la EPOC como una enfermedad que produce consecuencias sistémicas, semejantes a las que ocurren en el síndrome metabólico por obesidad, consistentes en hipertensión arterial, intolerancia a la insulina, hiperglucemia y dislipidemia.²⁵⁻²⁷

La presencia del estrés oxidativo ha sido descrita en unas cuantas publicaciones realizadas en pacientes con EPOC asociada a exposición doméstica a humo de leña, que han mostrado evidencia de incrementos en los niveles plasmáticos de MDA, así como de daño al DNA en grupos muy reducidos de pacientes.²⁸⁻³⁰ Recientemente se reportó la presencia de estrés oxidativo en humanos sanos expuestos de manera aguda al humo de leña dentro de cámaras de exposición por períodos de 4 y de 20 horas, mostrando incremento en los niveles del MDA plasmático,^{31,32} aunque estos estudios simulan más bien la situación de exposición aguda que ocurre en los incendios forestales, y de ningún modo la exposición doméstica sostenida por varias décadas al humo de

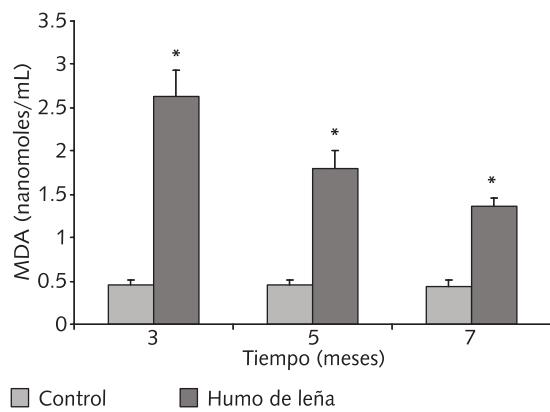


Figura 1. Concentración plasmática de MDA en cobayos expuestos diariamente al humo producido por 60 g de leña (madera de pino) por 5 días a la semana durante 3, 5 ó 7 meses. El contenido de MDA se incrementó a los 3, 5 y 7 meses medido como nmol/mL de plasma en cobayos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar, $n = 6$ por grupo; $p < 0.001$ con la prueba t de Student.

leña como la conocemos en los pacientes con EPOC que han sido estudiados en el INER;¹³⁻¹⁶ de cualquier modo, son una evidencia directa causa-efecto donde la exposición al humo de leña induce estrés oxidativo.

El incremento en la concentración de MDA plasmático ha sido asociado a la severidad, progresión clínica y deterioro del estado de salud en los pacientes que cursan con EPOC secundario al tabaquismo, tanto en las fases estables como en las de exacerbación.^{7,33-35} Este hecho le confiere relevancia a la presencia del estrés oxidativo que estamos mostrando en nuestro modelo de exposición al humo de leña en cobayos, dado que el MDA se mantuvo aumentado desde los 3 hasta 7 meses en que se terminó el modelo, a pesar de que va disminuyendo con el tiempo; lo cual pudiera deberse a la presencia de los mecanismos antioxidantes, o bien al incremento de otras moléculas oxidantes y antioxidantes que no fueron analizadas en este estudio. Por otra parte, el hecho de que se mantenga elevado el MDA se relaciona con otras características patogénicas progresivas previamente descritas en este modelo, consistentes en el incremento en la

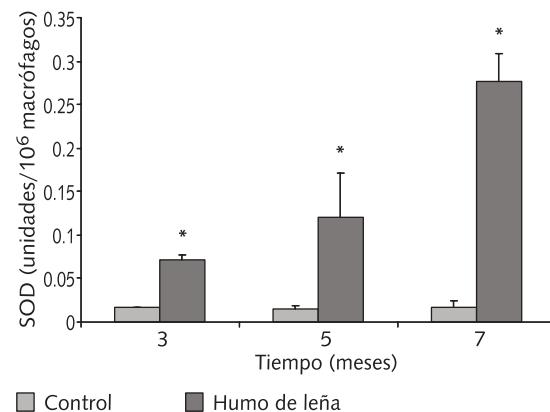


Figura 2. Actividad de la SOD en extractos de macrófagos del LBA en cobayos expuestos al humo producido por 60 g de leña (madera de pino)/día/5 días semana/3, 5, y 7 meses. La actividad se incrementó a los 3, 5 y 7 meses expresada como unidades/ 10^6 macrófagos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar, $n = 6$ por grupo; $p < 0.001$ con la prueba t de Student.

actividad de enzimas elastolíticas, collagenolíticas y gelatinolíticas, el desarrollo de lesiones enfisematosas, hipertensión arterial pulmonar, hiperplasia del músculo liso y apoptosis, lo que fue observado desde los 3 hasta los 7 meses de exposición.²³

Nuestros resultados concuerdan con otras evidencias. Tal es el caso de los análisis de grupos de pacientes con EPOC secundario a exposición a humo de cigarro y a humo de leña, comparados con sujetos sanos, en los que se observó la presencia de estrés oxidativo con aumento del MDA plasmático, así como incremento en la actividad de la SOD. Adicionalmente, se encontró una correlación negativa entre los niveles de MDA plasmático o la actividad de la SOD y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁, % del predicho); es decir, tanto el MDA como la actividad de la SOD se incrementan inversamente al decremento del FEV₁ de acuerdo con la fase de progresión de la EPOC desde el estadio I hasta el IV, según la clasificación del grupo GOLD.^{1,2,36}

En conclusión, nuestros hallazgos muestran la presencia de estrés oxidativo en la EPOC inducida por la exposición al humo de leña en cobayos.

REFERENCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Access date: -III-2008. Date last updated: December 2007. Available from: www.goldcopd.com/Guideline_Resources.asp?I152&I250.
2. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS Task Force. *Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper*. Eur Respir J 2004;23:932-946.
3. Shapiro SD, Ingelmo EP. *The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years*. Am J Respir Cell Mol Biol 2005;32:367-372.
4. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. *Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms*. Eur Respir J 2003;22:672-688.
5. Barnes PJ. *Mediators of chronic obstructive pulmonary disease*. Pharmacol Rev 2004;56:515-548.
6. Ofulue AF, Ko M, Abboud RT. *Time course of neutrophil and macrophage elastinolytic activities in cigarette smoke-induced emphysema*. Am J Physiol 1998;275(6 Pt 1):L1134-L1144.
7. Rahman I. *Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms*. Cell Biochem Biophys 2005;43:167-188.
8. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections*. Eur Respir J 2006;27:397-412.
9. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:532-555.
10. Rennard SI, Vestbo J. *COPD: the dangerous underestimate of 15%*. Lancet 2006;367:1216-1219.
11. Sies H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol 1997;82:291-295.
12. Leeuwenburgh Ch, Hansen P, Shaish A, Holloszy JO, Heincke JW. *Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1998;274:R453-R461.
13. Montaño M, Beccerril C, Ruiz V, Ramos C, Sansores RH, Gonzalez-Avila G. *Matrix metalloproteinases activity in COPD associated with wood smoke*. Chest 2004;125:466-472.
14. Perez-Padilla R, Regalado J, Vidal S, et al. *Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women: a case control study*. Am J Respir Crit Care Med 1996;154(3 Pt 1):701-706.
15. Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, et al. *Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco*. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:393-397.
16. Sandoval J, Salas J, Martinez-Guerra ML, et al. *Pulmonary arterial hypertension and cor pulmonale associated with chronic domestic woodsmoke inhalation*. Chest 1993;103:12-20.
17. Delgado J, Martinez LM, Sanchez TT, Ramirez A, Iturria C, Gonzalez- Avila G. *Lung cancer pathogenesis as- sociated with wood smoke exposure*. Chest 2005;128:124-131.
18. Desai MA, Mehta S, Smith KR. *Indoor smoke from solid fuels: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels*. Geneva, World Health Organization, 2004. (WHO Environmental Burden of Disease Series, No. 4).
19. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. *Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J 2006;27:542-546.
20. Fujita M, Nakanishi Y. *The pathogenesis of COPD: lessons learned from in vivo animal models*. Med Sci Monit 2007;13:RA19-RA24.
21. Fehrenbach H. *Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective*. Eur Respir Rev 2006;15:136-147.
22. Groneberg DA, Chung KF. *Models of chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res 2004;5:18.
23. Ramos C, Cisneros J, Gonzalez-Avila G, Beccerril C, Ruiz V, Montaño M. *Increase of matrix metalloproteinases in woodsmoke-induced lung emphysema in guinea pigs*. Inhal Toxicol 2009;21:119-132.
24. Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. *Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation*. Chem Res Toxicol 1998;11:1176-1183.
25. Agusti A, Soriano JB. *COPD as a systemic disease*. COPD 2008;5:133-138.
26. Petty TL. *Pulmonary rehabilitation of early COPD. COPD as a systemic disease*. Chest 1994;105:1636-1637.
27. Cobo AC, Fabián SMMG. *Tratamiento de la hipertensión arterial sistémica en pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2007;20:64-70.
28. Işık B, Işık RS, Akyıldız L, Topçu F. *Does biomass exposure affect serum MDA levels in women?* Inhal Toxicol 2005;17:695-697.
29. Kluchová Z, Petrásová D, Joppa P, Dorková Z, Tkáčová R. *The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD*. Physiol Res 2007;56:51-56.
30. Ceylan E, Kocigit A, Gencer M, Aksøy N, Selek S. *Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass*. Respir Med 2006;100:1270-1276.
31. Barregard L, Sällsten G, Andersson L, et al. *Experimental exposure to wood smoke: effects on airway inflammation and oxidative stress*. Occup Environ Med 2008;65:319-324.
32. Agacdiyen A, Basyigit I, Ozden M, et al. *The effects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD*. Respirology 2004;9:38-42.
33. Joppa P, Petrásová D, Stancák B, Dorková Z, Tkáčová R. *Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension*. Wien Klin Wochenschr 2007;119:428-434.

34. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, et al. *Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD*. Thorax 2005;60:293-300.
35. Kluchová Z, Petrásová D, Joppa P, Dorková Z, Tkáčová R. *The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD*. Physiol Res 2007;56:51-56.
36. Montaño M, Cisneros J, Ramírez-Venegas A, et al. *Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV₁ in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking*. Inhal Toxicol. En prensa 2010.

✉ Correspondencia:

Dr. Carlos Ramos Abraham,
Departamento de Investigación en
Fibrosis Pulmonar. Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias Ismael
Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502,
colonia Sección XVI.
México, D.F., 14080
Teléfono: (0155) 5487-1700,
extensión 5257, fax: (0155) 5665 4623
Correo electrónico:
cramosa@prodigy.net.mx