

*21/1 62*



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**  
FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACION DE COMPLEMENTO EN SECRECIONES  
PULMONARES DE RATA Y SU ACTIVACION "IN VITRO"  
POR POLVOS INORGANICOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
Químico Farmacéutico Biólogo  
P R E S E N T A :  
NORMA ALICIA HERNANDEZ RODRIGUEZ**

**México, D. F.**

**1987**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

AEREVIATURAS EMPLEADAS.

LEA	Lavado bronquialveolar de rata.
LN	Lavado normal.
LAC	Lavado activado con crisótilo.
LAZ	Lavado activado con zimosán.
LAPM	Lavado activado con polvo de Mexicali.
LAS	Lavado activado con sílice cristalino (cuarzo).
SSAF	Solución salina amortiguada con fosfatos.
EA	Eritrocitos sensibilizados.
AGV	Amortiguador de gelatina y veronal.
SSI	Solución salina isotónica.
CAMPS	Cámaras a alto aumento (100 X).
SAC	Suero activado con crisótilo.
SAZ	Suero activado con zimosán.
SAPM	Suero activado con polvo de Mexicali.
SAS	Suero activado con sílice cristalino (cuarzo).
SN	Suero normal de rata.
UCH <sub>50</sub>	Unidades de complemento hemolítico al 50%.

# INDICE

Página

I	INTRODUCCION	1
II	ANTECEDENTES	6
	A. Neumoconiosis	6
	1. Historia	6
	2. Clasificación de neumoconiosis	7
	3. Factores anatómicos	10
	4. Mecanismos pulmonares	11
	5. Características físicas de las partículas	13
	6. Patología	14
	B. Asbestosis	14
	1. Definición	14
	2. Las fibras de asbesto. Características	15
	3. Asbesto y respuesta macrofágica	15
	4. Factores anatómicos	17
	5. Asbesto y cáncer	17
	C. Silicosis	18
	1. Definición	18
	2. Características de la exposición	19
	3. Patogénesis	19
	4. Patología	21
	D. Fibrosis intersticial por feldepatos	22
	1. Polvo de Mexicali	22
III	MATERIALES Y METODOS	24
	A. Lavado bronquio-alveolar (LBA)	24
	B. Suero normal	26
	C. Identificación de complemento en LBA y suero	26
	D. Activación "in vitro" de suero y LBA en presencia de polvos inorgánicos	28
	E. Determinación de complemento hemolítico en suero y LBA activados con polvos inorgánicos	31
	F. Quimiotaxis inducida por LBA activado por polvos inorgánicos	31

TESIS CON.  
**FALLAS DE ORIGEN**

	Página
G. Presencia de endotoxina	35
H. Estadística	37
IV RESULTADOS	38
A. Identificación de complemento en suero y LBA	38
B. Quimiotaxis inducida por LBA activado por polvos inorgánicos	44
C. Presencia de endotoxina	55
V DISCUSION DE RESULTADOS	56
VI CONCLUSIONES	68
RESUMEN	69
VII BIBLIOGRAFIA	71
APENDICE	77
ANEXO	82

## I INTRODUCCION.

La contaminación ambiental en la ciudad de México es un problema creciente del cual desconocemos muchas características de sus contaminantes. El óxido de azufre, monóxido de carbono, hidrocarburos policíclicos, ozono, silicatos no asbestos, asbestos, plomo, cadmio, etc., son algunos de los contaminantes existentes en el aire de las grandes metrópolis que han sido reportados como patógenos. Dichos contaminantes son capaces de causar lesiones en diversos órganos, sin embargo, el aparato respiratorio es el más susceptible ya que hay riesgo de contraer cáncer y fibrosis pulmonar (40 58).

Aún cuando la contaminación en la ciudad de México es un problema que está afectando a la salud de sus habitantes, la mayoría de los informes de trabajo son de origen extranjero y son inadecuados para el caso. Estos no consideran algunos factores de gran importancia, relacionados con condiciones particulares de la zona, como son: su altitud sobre el nivel del mar de 2 240m que induce cambios en la mecánica ventilatoria de sus habitantes (35); el clima que produce inversión térmica; la erosión eólica (tolvaneras), etc.. Estos factores aumentan las probabilidades de que los contaminantes afecten la salud de la población. En la ciudad de México se han estudiado las enfermedades pulmonares producidas por la inhalación de polvos inorgánicos, (neumoconiosis), cuando se asocian con enfermedad de tipo laboral. Sin embargo, debido a los altos niveles de contaminación ambiental, se esperaría que este tipo de problemas ha trascendido a medios no laborales, pero su diagnóstico

co es difícil por el desconocimiento de los agentes causales.

Aunado a estos problemas, se encuentra el hecho de que las lesiones pulmonares debidas a la inhalación de polvos inorgánicos en humanos, se manifiestan generalmente varios años después del inicio de exposición. Esto resulta en afecciones pulmonares por ejemplo intersticiales producidas lentamente por la contaminación atmosférica. El tiempo de exposición se convierte entonces, en una variable de importancia sobre la susceptibilidad individual.

El problema de la contaminación en México está alcanzando el tiempo crítico (20 años) en que se espera ver un aumento en ciertas enfermedades pulmonares, causadas por la inhalación de polvos inorgánicos y que al llegar a los alveolos e intersticio pulmonar provocan reacciones inflamatorias. Esto depende del tipo de polvo inhalado, de su concentración en el ambiente y del tiempo de exposición.

En relación a la patología pulmonar, los polvos se clasifican en inertes y fibrogénicos. Los primeros no producen reacción inflamatoria, en tanto que los segundos sí lo hacen. Además, los polvos fibrogénicos causan una reacción esclerótica progresiva del tejido conjuntivo pulmonar, produciéndose en consecuencia, la destrucción de amplias porciones de parénquima respiratorio e induciéndose insuficiencia pulmonar, así como predisposición a otras afecciones como la tuberculosis (66).

A pesar de que tradicionalmente se han correlacionado los efectos de gases y partículas sobre la salud (35), en años recientes se ha puesto énfasis en el estudio de los efectos de partículas, esta-



bleciéndose patrones de depósito inicial en el pulmón, mecanismos de respuesta pulmonar temprana a la presencia de polvos y mecanismos patogénicos de daño. En este tipo de estudios es donde los modelos de asbestosis y silicosis experimental han sido de gran ayuda (7, 62 y 63).

Actualmente, la investigación sobre contaminación por partículas busca responder preguntas como: ¿En qué forma afectan las partículas al organismo?, ¿Cómo responde el organismo a la presencia de partículas extrañas?, ¿Qué células son las que se involucran, si es que lo hacen, en su eliminación?, ¿Responden éstas a estímulos quimiotácticos?, ¿Se relacionan los mecanismos del sistema inmune con la eliminación de partículas inorgánicas a nivel pulmonar?, ¿Cuál es la efectividad de estos mecanismos?

Debido a las preguntas anteriormente expuestas y con la intención de conocer los riesgos de enfermedades asociadas con partículas contaminantes, se hace indispensable estudiar la caracterización de las partículas suspendidas en el aire, así como también, realizar estudios epidemiológicos, pruebas en animales de experimentación y ensayos celulares "in vitro" (6).

Actualmente se sabe que el sitio de depósito inicial de algunas partículas como el asbesto, producen una acumulación de macrófagos alveolares y se conoce que esta respuesta está mediada por complemento (62,61).

Sin embargo, existen otras partículas v.g. cuarzo, capaces de provocar una respuesta idéntica, sin que se conozca su rela-

ción con la capacidad de activar complemento en suero y menos aún en lavado pulmonar.

Así, el objetivo que tiene este trabajo es el estudio de otros polvos diferentes al asbesto, cuarzo y polvo de Mexicali, en relación a su capacidad de activar complemento en secreción pulmonar "in vitro", con el propósito de intentar dilucidar, si los mecanismos de respuesta inicial a dichos polvos son similares a los del asbesto. Por lo tanto como hipótesis de trabajo se considera que si los polvos diferentes a asbesto producen una respuesta pulmonar temprana similar a éste, se esperaría que estos polvos iniciaran esta respuesta activando complemento de la secreción pulmonar.

Con la finalidad de resolver estas preguntas, se trabajó con lavado pulmonar de rata buscando primeramente la identificación del complemento por el método de Mayer y por inmunodifusión con un suero anti-C<sub>3</sub> de rata. Una vez que se detectó complemento en secreción pulmonar, se trató de activarlo "in vitro" con polvos inorgánicos y se evaluó la respuesta quimiotáctica en dichas secreciones pulmonares activadas.

Después de comprobar la activación de complemento en secreción pulmonar, se intentó establecer la vía de activación del mismo, clásica o alterna, usando inhibidores de tales vías como EDTA y EGTA.

Se incluye una sección de antecedentes en que se tratan primeramente las generalidades de las neumoconiosis, así como algunos de los aspectos más sobresalientes de dos neumoconiosis: la asbes-

tosis y la silicosis, que son las entidades que se presentan con -  
más frecuencia y por consiguiente han sido más estudiadas. Así mis-  
mo se anexa un capítulo sobre un tipo de fibrosis por feldespatos  
cuyo origen está en un caso local, proveniente de una paciente me-  
xicana de Mexicali B.C.

## II ANTECEDENTES.

## A. NEUMOCONIOSIS

### 1. Historia.

Se ha establecido que el hombre ha padecido enfermedades pulmonares causadas por la inhalación de polvos inorgánicos, desde hace muchos siglos; existen evidencias obtenidas por pruebas histológicas realizadas en pulmones de momias egipcias, que desde entonces existía el depósito de partículas de sílice y hierro en estos órganos. Incluso se sabe que los Beduinos padecían la neumoconiosis por arena (1,59).

Las enfermedades pulmonares son mencionadas y descritas posteriormente por Agricola (1556), Diemerbroeck (1672) y Ramazzini (1713). Tiempo después, con la introducción de maquinaria en las granjas y el advenimiento de la revolución industrial en el siglo XVIII, se incrementa la producción de nubes de polvo conteniendo altas concentraciones de partículas respirables (menos de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro) provenientes de las nuevas industrias. En 1838 Stanton introduce el término antracótico para describir los pulmones negros de los trabajadores del carbón (19) y no es sino hasta 1866, en que Zenker asigna el nombre genérico de neumoconiosis, al grupo de enfermedades producidas por la inhalación de partículas (66).

En 1870 Visconti introduce el término de silicosis: la detección de esta enfermedad, así como su asociación con los mineros tardó dieciseis años, Haldner en 1902 describe la patología de la

silicosis y Collis en 1915, propone que el sílice cristalino es el causante de tales enfermedades. Los efectos adversos del asbesto - son reportados hasta 1907 (66).

La frecuencia de este tipo de enfermedad fue incrementándose, hasta que hace algunos años se estableció y caracterizó la relación de riesgo laboral para los trabajadores expuestos a altas dosis de sílice y asbesto.

Actualmente las neumoconiosis son consideradas como enfermedades laborales, sin embargo, debido al largo período que se requiere para que se manifiesten, no se le ha dado mayor importancia a la trascendencia de este problema sobre la población en general.

## 2. Clasificación de neumoconiosis.

En el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (1986) se realizó una recopilación de las diversas clasificaciones de enfermedades respiratorias ocupacionales en las que se incluyen las producidas por partículas de fibras, el tipo más frecuente de exposición a éstas y las enfermedades que producen. Dicha clasificación se ilustra a continuación (36, 42).

## NEUMOCONIOSIS.

Partícula	Enfermedad	Exposición
Sílice cristalino	Silicosis	Minería, alfarería limpiadores con chorro de arena.
Asbesto	Asbestosis Mesotelioma Cáncer pulmonar	Minería, construcción y aislamiento. Algunas en población abierta.
Carbón	Antracosis con fibrosis progresiva.	Minería.
Silicatos:		
Fibra de vidrio	Fibrosis, mesotelioma y cáncer.	Industrial.
Talco	Talcosis	Drogadictos
Tierra diatomácea caolín	Silicatosis	Industrial. Alfareros y trabajadores de porcelana.
Feldespatos		Tolvaneros o erupciones volcánicas.
Mica		Minería, manufacturas, granjeros.
Berilio	Beriliosis	Industrial.

Partícula	Enfermedad	Exposición
	Máculas de polvo (*)	
Al	Aluminosis	Industrial
Fe	Siderosis	Industrial. Soldadores.
	Enf. de los mine- ros de la Hemati- ta.	Minería.
	Pulidores de pla- ta.	Orfebrería
Ti	Pulmón de titanio	Industrial
Sn	Estanosis	Industrial.
Ba	Baritosis	Minería

(\*) Nota: La mayoría de estos elementos se acumulan en el pulmón en forma de máculas sin que haya mayor alteración intersticial, sin embargo, se han reportado casos graves de afección pulmonar como en la enfermedad de los mineros de la hematita. Existen enfermedades por la inhalación de vapores con mercurio, cadmio, bauxita, berilio, enfermedad de los soldadores de arco, etc..



### 3. Factores anatómicos.

Existen tres regiones anatomofuncionales en el tracto respiratorio: la nasofaringe, el árbol traqueal que llega hasta los bronquiolos terminales y el parénquima pulmonar (alveolos).

La nariz, es un buen filtro de partículas hasta de  $12 \mu\text{m}$ , el árbol traqueal es el sitio de depósito de 10-20% de partículas más pequeñas ( $0.01-0.1 \mu\text{m}$ ) y del 10-15% de las partículas de  $1-10 \mu\text{m}$ .

Estas partículas pueden ser eliminadas por movimiento mucociliar, siendo así el árbol traqueal un filtro para los alveolos. En la región alveolar se depositan partículas de diámetro promedio - igual a  $3.5 \mu\text{m}$  principalmente (37).

En los últimos años ha sido de gran importancia dilucidar el patrón de depósito inicial de las partículas inhaladas (5, 45). Se sabe que las partículas inhaladas, que tienen un diámetro inferior a  $5 \mu\text{m}$ , son capaces de llegar a la región del parénquima pulmonar, impactándose en las bifurcaciones de ductos alveolares. Aquí algunas partículas son tomadas por células presentes en esta región - y transportadas, ya sea a vasos sanguíneos, al intersticio o al sistema mucociliar.

Otras partículas son capaces de activar factores quimiotácticos que median la acumulación de macrófagos en el sitio de depósito inicial (8).

#### 4. Mecanismos pulmonares.

-Mecanismos de depósito de partículas en el tracto respiratorio.

Estos mecanismos son: impactación inicial, sedimentación, difusión o movimiento Browniano, precipitación electrostática e interceptación. La impactación inicial es el depósito de una partícula en el árbol traqueal determinado por su momentum. En el caso de la sedimentación, el depósito de partículas está influenciado por la gravedad, ya que caen a una velocidad constante siguiendo la ley de Stokes (la fuerza de resistencia que actúa sobre un cuerpo esférico pequeño que cae a través de un medio que ofrece resistencia, está determinada por la viscosidad del medio y la velocidad constante del cuerpo:), representando éste, un mecanismo de gran importancia en los bronquiolos pequeños. La difusión o movimiento Browniano es importante en partículas pequeñas inferiores a  $0.1\mu\text{m}$  de diámetro, la energía cinética que poseen, resulta en una difusión turbulenta que puede llegar a ser significativa en el patrón de depósito. El depósito de partículas irregulares o fibras naturales es importante debido a que pueden ser interceptadas por las paredes de los bronquiolos terminales o bifurcaciones, mecanismo que tiene gran relevancia en enfermedades pulmonares tales como la asbestosis. La precipitación electrostática no ha sido muy estudiada, sin embargo, resulta de importancia limitada en el hombre (37).

-Mecanismos de eliminación de partículas en el tracto respiratorio.

Los mecanismos de eliminación son anatómico-dependientes, generalmente las partículas solubles son rápidamente "asimiladas" a través de las membranas mucosas, llevadas a los capilares y eliminadas; en tanto que las partículas insolubles son eliminadas mecánicamente.

La porción posterior de la nariz y parte baja del árbol traqueal están constituidos por un epitelio ciliado productor de moco, donde se depositan los materiales insolubles y son transportados por el movimiento mucociliar a la faringe para ser eliminados. En la región alveolar, las partículas son eliminadas ya sea por mecanismos de absorción o mecánicos. Las partículas solubles pasan a la linfa (38) y a capilares sanguíneos o se unen a proteínas del intersticio.

El mecanismo más importante de eliminación de partículas insolubles en la región alveolar es la fagocitosis por macrófagos alveolares (30), constituyendo un mecanismo rápido capaz de eliminar un 60% de partículas.

Pese a lo anterior, la tasa de eliminación de partículas por macrófagos semeja un "plateau" y si la cantidad de polvo que llega al pulmón es muy grande, quedan partículas libres en la superficie alveolar. Esto deja paso a los mecanismos lentos que son capaces de eliminar 40% de partículas por un gradiente en el fluido alveolar que envía a las partículas hacia el aparato mucociliar y la migra -

ción de partículas hacia el intersticio o hacia los linfáticos (33).

Anteriormente fue propuesto un mecanismo de eliminación alveolar por ruta intersticial (60), en el cual las partículas migran a través del epitelio alveolar ya sea por endocitosis o por transporte en macrófagos (4).

Existe una correlación entre el depósito y eliminación de partículas, con la cantidad y características del aerosol inhalado -- (33). Incluso se ha desarrollado una ecuación matemática que relaciona la retención y predicción de cinética de permanencia de las partículas, como una función del tiempo de exposición, estableciéndose un equilibrio entre el depósito y la eliminación de las partículas (15).

##### 5. Características físicas de las partículas dañinas.

El único polvo que puede llegar aquí debe pasar por el tracto respiratorio alto y por consiguiente tener las siguientes características:

-Las partículas deben tener un diámetro menor de  $3.5 \mu\text{m}$ , ya que las mayores no provocan cambios en la región alveolar porque son eliminadas en el tracto respiratorio alto.

-La eficiencia para eliminar partículas de los espacios pulmonares es alta para partículas de diámetro inferior a  $2 \mu\text{m}$ . Sin embargo, el mayor depósito de partículas corresponde a aquellas con un diámetro hasta de  $3.5 \mu\text{m}$ .

-Hay variaciones sustanciales en el depósito que dependen del patrón respiratorio de cada individuo (20).

## 6. Patología.

Las lesiones pulmonares específicas inducidas por polvos minerales, se caracterizan por una fibrosis marcada (25) y la pigmentación de los bronquiolos asociada con bronquiolitis (13). Las lesiones son dependientes de dosis, tiempos de exposición, tamaño y características físicoquímicas de las partículas, en relación a la susceptibilidad individual.

## B. ASBESTOSIS.

### 1. Definición.

La asbestosis se define como una fibrosis pulmonar intersticial difusa causada por la inhalación de fibras de asbesto respirables, en presencia o ausencia de reacción inflamatoria pleural(3).

La exposición a asbesto puede conducir al desarrollo de las siguientes anomalías en el pulmón y otros órganos:

Cuerpos de asbesto en el pulmón y esputo, fibrosis intersticial pulmonar, pleura hialina, placas pleurales calcificadas, car -

cinoma broncogénico asociado con asbestosis, mesotelioma maligno - de la pleura y peritoneo y carcinoma gastrointestinal.

## 2. Las fibras de asbesto. Características.

Asbesto es un término genérico dado a un grupo de minerales - fibrosos con la característica común de resistir a altas temperatu- ras. Los principales tipos de asbesto son: crisótilo (asbesto blan- co), amosita (asbesto café), antofilita y crocidolita (asbesto azul).

El tipo de asbesto es un factor importante al considerar el - riesgo de enfermedad, así por ejemplo, el mesotelioma se encuentra con mayor frecuencia asociado de manera decreciente a exposiciones de crocidolita, amosita, crisótilo y antofilita. No obstante la cito toxicidad mayor se atribuye al crisótilo (2).

## 3. Asbesto y respuesta macrofágica.

Aunque la asociación entre la exposición a asbesto y el desarro- llo de una enfermedad fibrótica pulmonar ha sido conocido por déca- das, los mecanismos patogénicos básicos de la asbestosis no se han dilucidado. Los macrófagos juegan un papel fundamental en la patoge- nesis de las enfermedades pulmonares, la ingestión de ciertas partí- culas por macrófagos causa la liberación de sustancias "in vivo" -

como las monocinas (23) que atraen a los fibroblastos dando lugar a respuestas fibrogénicas, o bien, las enzimas lisosomales y proteasas pueden llegar a matar al macrófago.

Aunado a esto, los macrófagos de tejido conectivo pueden contribuir a la enfermedad pulmonar por concentración y almacenamiento de agentes potencialmente carcinogénicos, tales como el benzopireno. Así aun cuando los macrófagos sirven como primera línea de defensa de la superficie alveolar (31), también pueden ser capaces de dañar al organismo mientras ejercen su rol defensivo (6).

Se ha propuesto a los macrófagos alveolares como mediadores potenciales del proceso patogénico, ya que el depósito de asbesto trae como consecuencia la acumulación de éstos en las bifurcaciones de los ductos alveolares; lugar donde las fibras son fagocitadas. Dicha fagocitosis puede estimular la liberación de metabolitos del ácido araquidónico. La secreción resultante puede contener potentes mediadores causantes de inflamación inducida por el asbesto (22).

Warheit et. al. (1985) han propuesto que la acumulación "in vivo" de macrófagos en los sitios de depósito de las partículas, es el resultado de la activación del complemento por la vía alterna. Este hecho sería el resultado de activar al complemento presente en la secreción pulmonar por el asbesto. Consecuentemente se produciría el factor  $C_5a$  que posee la propiedad de ser quimiotáctico para macrófagos (62).

#### 4. Factores anatómicos.

En la neumoconiosis por asbesto los primeros cambios suceden al nivel de bronquiolos respiratorios, donde se acumulan las partículas, macrófagos y fibras de colágena, constituyéndose así la lesión básica de la asbestosis llamada fibrosis peribroncual.

#### 5. Asbesto y cáncer.

El asbesto se conoce desde hace mucho tiempo como un polvo biológicamente activo (48), el tipo de lesiones que causa son características, como lo son también, el tipo de padecimientos a los que se asocia o determina una mayor propensión. Así el adenocarcinoma y el mesotelioma son los tipos de cáncer pulmonar más frecuentes en trabajadores expuestos a asbesto (12).

Varios estudios demuestran que los diferentes tipos de asbesto de uso comercial (?) causan cáncer pulmonar en humanos (17). Aunado a lo anterior, la presencia de otros agentes tales como el tabaquismo, aumentan la propensión de complicación pulmonar (11,58).

Por otra parte se ha encontrado que las células mesoteliales son de 10 a 100 veces más sensibles a los efectos de citotoxicidad de las fibras del asbesto, con respecto al epitelio bronquial humano, predisponiéndose así este tejido a la formación de mesoteliomas (26).

En 1981 Stanton propuso una hipótesis en la que se considera-



ba al número de fibras de asbesto dentro de un intervalo menor o igual a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y mayor de 8  $\mu\text{m}$  de largo, como el factor determinante en la producción de mesoteliomas (16,55). Actualmente la hipótesis de Stanton no se considera exacta y hay evidencia de que la variable determinante es una relación constante de 100:1 entre el largo y el diámetro de las fibras para conservar su potencial carcinogénico (24).

## C. SILICOSIS.

### 1. Definición.

La silicosis es una enfermedad pulmonar caracterizada por fibrosis nodular hialina producida por la inhalación prolongada de partículas o polvo de sílice (por ejemplo cuarzo). Pueden clasificarse tres tipos de silicosis:

- a) Silicosis crónica. En la que la duración de la exposición a sílice excede a 20 años.
- b) Silicosis acelerada. En este caso la duración de la exposición es usualmente entre 5 y 15 años.
- c) Silicosis aguda. La duración de la exposición generalmente es inferior a 5 años (66).

## 2. Características de la exposición.

El sílice se encuentra en tres diferentes formas: cuarzo y tridimita con cristales hexagonales y cristobalita de cristales cúbicos. Aunque el daño pulmonar por silicosis se atribuye al sílice cristalino (cuarzo), existen evidencias del posible potencial dañino del sílice amorfo (63). Las formas no combinadas de dióxido de silicio, son llamadas de manera colectiva sílice libre, para distinguirlo de los silicatos que contienen cationes en estructuras de cadenas complejas.

El alto porcentaje de  $\text{SiO}_2$  en la tierra, así como, el frecuente empleo del mismo en la industria, por sus propiedades de dureza, aumentan el índice de incidencia de enfermedades pulmonares por sílice.

El desarrollo de la silicosis depende de la inhalación de partículas respirables (menos de  $5 \mu\text{m}$ ). En algunas industrias se determina el riesgo de enfermedad según el grado de partículas de sílice respirables medido en  $\text{mg}$  de polvo/ $\text{m}^3$ . Se emplean diversos métodos para medir la concentración de polvo en el aire, como: sedimentación por gravedad, centrifugación, filtración, impregnación, precipitación electrostática y precipitación térmica (58).

## 3. Patogénesis.

Anteriormente se pensaba que los eventos en la patogénesis --

de la silicosis eran: inhalación de partículas de sílice; su penetración y retención en la periferia pulmonar; la ingestión de partículas por los macrófagos; la subsecuente muerte de los macrófagos; la liberación del contenido de las células muertas incluyendo las partículas de sílice; la ingestión de sílice por otros macrófagos y sus muertes; acumulación gradual de otras células; producción de colágena; hialinización y una posible complicación como tuberculosis (66). Actualmente se sabe que además de lo anterior, existen una gran cantidad de eventos que ocurren antes de la muerte de los macrófagos. Estos desencadenan la lesión característica que es mediada por los factores solubles que secreta el macrófago, como las monocinas. Así, se sabe que la exposición crónica a sílice causa enfermedad fibrótica pulmonar. Aún en períodos cortos de exposición, se ha visto el depósito de cuarzo en compartimentos anatómicos extra alveolares por traslocación del cuarzo del espacio aéreo al intersticio (7). Se postula entonces que la fibrosis silicótica está mediada por los macrófagos y sus factores solubles como la interleucina 1 que se sabe es capaz de activar a los fibroblastos (-50).

En los estados tempranos la infiltración de células al intersticio y espacios aéreos predominantemente está compuesta de macrófagos y después aparecen polimorfonucleares (28). El sílice induce la liberación de factores quimiotácticos que estimulan a polimorfonucleares, amplificándose la respuesta inflamatoria (29,34).

Se piensa en la existencia de un posible papel de los facto -

res genéticos en el daño pulmonar por sílice, debido a la variabilidad de datos encontrados según las diferentes cepas de ratón empleadas (cada una con un locus diferente) (9).

Por otra parte, el riesgo está determinado por la liberación de enzimas lisosomales, como lactato deshidrogenasa; fosfatasa ácida, N-acetil- $\beta$ -D-glucosamidasa, etc., estimuladas por la presencia del sílice (53).

#### 4. Patología.

Generalmente la enfermedad cursa como crónica, teniendo como síntomas tempranos, expectoración aunada a una respiración cortada y con esfuerzo, disnea en el esfuerzo, pérdida de peso asociada a la alta predisposición a infecciones como la tuberculosis o infecciones de tipo micótico (38).

Así, el pulmón silicótico presenta característicamente la presencia de nódulos fibróticos verde-grisáceo de un diámetro de 2-3 mm, constituidos de una masa densa de tejido fibroso de colágeno hialina en arreglos concéntricos. Algunas veces pueden encontrarse pequeñas cavidades en el centro de éstos, conteniendo fluidos caseos y purulentos. Además, puede existir una lipoproteínosis alveolar asociada a la enfermedad (52, 46).

Se observa así mismo la afección a nivel alveolar provocada por la presencia de las partículas irritantes, proliferación de ma

cr6fagos alveolares y c6lulas epiteliales pulmonares y da1o a nivel de membrana basal alveolar.

Asi mismo, la inyecci6n intratraqueal de  $\alpha$ -cuarzo provoca inflamaci6n pulmonar con incremento del n6mero de c6lulas pulmonares y en el contenido de prote6nas en lavado pulmonar. Tambi6n se ha detectado la presencia de hidroxiprolina, como indicio del aumento de col6gena en este tejido.

Aunado a lo anterior, se tienen datos que hablan del hecho de que generalmente la silicosis se asocia a enfermedades autoinmunes de la col6gena, que influyen en el curso de las neumoconiosis (66).

#### D. FIBROSIS INTERSTICIAL POR FELDESPATOS.

##### 1. Polvo de Mexicali.

El polvo de Mexicali se empez6 a estudiar, debido a que en el Departamento de Cardioneumolog6a del Instituto Nacional de Cardiolog6a Ignacio Ch6vez se present6 el caso de una paciente de 23 a1os de edad, habitante de la ciudad de Mexicali, B.C., a quien se diagnostic6 por biopsia pulmonar una enfermedad granulomatosa intersticial por cuerpo extraño.

El estudio por espectrometr6a de rayos X del material presente en los granulomas, revel6 la presencia anormal de part6culas compuestas por aluminio, silicio y potasio. El estudio por espectro

metría y difracción de rayos X (\*) de las muestras colectadas en el ambiente doméstico de la paciente demostraron tener una composición similar a la encontrada en el polvo de la biopsia pulmonar (41).

El material se identificó como una mezcla de partículas con 85% de aluminosilicatos y el resto arcillas y cuarzo (39).

Hasta el momento, se conoce sólo la citotoxicidad del polvo de Mexicali por haberse medido su capacidad hemolítica (todavía mayor a la del cuarzo). Sin embargo, todavía no se ha dilucidado su mecanismo de patogénesis (64).

Este caso del polvo de Mexicali representa un ejemplo de enfermedad no ocupacional inducida por polvos inorgánicos y lo cual es un ejemplo patente de cómo los altos índices de contaminación ambiental pueden trascender a medios no laborales, estos hechos enfatizan la importancia de estudiar las partículas suspendidas en el aire y su potencial patógeno.

(\*) Nota: La prueba de la composición del polvo de Mexicali se efectuó mediante análisis de difracción de rayos X realizado por el Dr. Liberto de Pablo en el Instituto de Geología de la U.N.A.M.

### III. MATERIALES Y METODOS.

Rata Wistar  
♂ 200-300g.

Obtención de  
suero

Activación del  
suero "in vitro"  
por polvos inor-  
gánicos.

Obtención de  
LBA

Detección y semi-  
cuantificación -  
de endotoxina.

Tratamiento de LBA:  
a. Centrifugación.  
b. concentración.  
c. determinación de  
proteínas.  
d. liofilización  
e. Reconstitución y  
activación "in vi-  
tro" por polvos inor-  
gánicos.

Obtención de  
macrófagos alveo-  
lares.

Evaluación de cé-  
lulas:  
a. Conteo de célu-  
las y tinción vital.  
b. Tinción citoquí-  
mica.  
c. Cuenta diferen-  
cial.

Identificación  
de complemento

Determinación  
de complemento  
por el método de  
Mayer en suero

Determinación  
de complemento  
por el método  
de Mayer en LBA

Inmunodifusión

Prueba de Ouchterlony  
en diluciones de suero  
normal con suero anti- $C_3$ .

Prueba de Ouchterlony  
en LBA (diluciones)  
con suero anti- $C_3$   
de rata.

Quimiotaxis

Concentración óp-  
tima de polvo en  
LBA concentrado. A

Curva Dosis-Res-  
puesta.

Confirmación de  
quimiotaxis.

Influencia de in-  
hibidores de vías  
de activación de  
complemento clásica  
y alterna.



## A. LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (LBA).

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon ratas Wistar albinas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.

Se trabajó con machos de doscientos a trescientos gramos de peso sin enfermedad pulmonar evidente, tanto para la obtención de lavado pulmonar y suero, así como para los experimentos de quimiotaxis en los cuales se requieren macrófagos alveolares.

Las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de Nembutal (pentobarbital sódico), administrando 50 mg/kg de peso.

Una vez muerta la rata se expuso la tráquea, practicando en ella una pequeña incisión en la que se introdujo una cánula del número dieciséis que se sujetó con hilo de algodón. Los pulmones se extrajeron de la cavidad torácica y se aseguraron a una jeringa en posición vertical. Se procedió a llenarlos por gravedad con 10 a 15 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF) a pH 7.3, libre de calcio y magnesio. El lavado se recolectó mediante un ligero masaje pulmonar. Este procedimiento se repitió hasta coleccionar un volumen final de 50 ml de lavado bronquio-alveolar (\*).

(\* Nota: Todo el material empleado para la obtención y manejo subsecuente de LBA se trató previamente para tenerlo libre de endotoxina (ver sección G).

El lavado bronquio-alveolar se procesó en dos pasos de centrifugación. El primero de éstos para eliminar células, macrófagos alveolares principalmente, (250 X g por 10 minutos) y un segundo paso de centrifugación a alta velocidad (170.000 X g durante 60 minutos) para eliminar dendritas, moco y lípidos como surfactantes.

El LEA una vez centrifugado, se dializó contra agua destilada para eliminar las sales que pudieran interferir en los experimentos subsecuentes de quimiotaxis. La diálisis se siguió hasta el equilibrio a una concentración final de 4-5 ppm de NaCl.

La solución se concentró mediante diálisis con Aquacide (\*) hasta reducir el volumen a una quinta parte de la cantidad original. Las membranas de diálisis se emplearon con un diámetro promedio de poro de retención de 10 000 en peso molecular.

Todos los pasos antes citados se realizaron a 4°C para evitar la desnaturalización de la proteína obtenida de la secreción pulmonar.

Posteriormente se efectuó una determinación de proteínas por el método de Lowry (27) con la finalidad de lograr una concentración última de proteína de 1.2 mg/ml, tanto para la detección y activación del complemento así como para la quimiotaxis.

Una vez conocida la concentración de proteína de lavado pulmonar, se sometió a un proceso de liofilización (\*\*\*) para su conservación.

(\*) Calbiochem-Behring Corporation, La Jolla, California.

(\*\*) La liofilización se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Nuclear de I.N.C.I.Ch.

La proteína liofilizada se resuspendió en medio de cultivo - RPMI 1640 (ver anexo) adicionado de 2 g de bicarbonato de sodio por litro y suplementado con albúmina sérica bovina al 2% y ácido N-2 - hidroxietilpiperacina-N'-etano sulfónico (HEPES) (ver anexo) en una concentración final de 10mM. Se empleó este medio amortiguador para resuspender la proteína ya que es el medio necesario para llevar a cabo la quimiotaxis, y con la finalidad de poder establecer las posibles correlaciones entre las diferentes series de experimentos realizados.

#### B. SUERO NORMAL.

El suero empleado para la determinación de complemento se obtuvo de las mismas ratas a las cuales se efectuó el LBA; durante la anestesia antes que la rata muriera se sangró a blanco por punción cardíaca para obtener el mayor volumen de sangre posible.

#### C. IDENTIFICACION DE COMPLEMENTO EN LAVADO Y SUERO.

La determinación de complemento en suero de rata se efectuó por el método de Mayer (32). Se probaron diferentes diluciones de suero de rata 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100 y se trabajó finalmente con la dilución 1:75, debido a que en ésta se obtuvieron lectu -

ras de hemólisis con todos los volúmenes probados. Todas las diluciones se efectuaron con amortiguador de veronal y gelatina (AGV) libre de iones calcio y magnesio.

Se trabajó con eritrocitos de carnero sensibilizados a una concentración de  $1 \times 10^9$ /ml adicionados a las diluciones del suero de rata 1:75; la mezcla anterior se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 minutos, después de la incubación se añadieron 1.5 ml de AVG frío, se mezcló, se centrifugó a 1100 rpm por diez minutos y se leyó en un espectrofotómetro a 540nm.

En cada serie de experimentos realizados se contó con un blanco, preparado con AVG y eritrocitos sensibilizados y un control de 100% de hemólisis que contenía agua destilada y eritrocitos. Ambos, se mantuvieron en las mismas condiciones antes mencionadas para los problemas.

A partir de los datos de absorción obtenidos, se calcularon las unidades  $\text{CH}_{50}$  (complemento hemolítico al 50% de lisis), mediante la ecuación de Von Krogh: que describe el curso de la curva de hemólisis:

$$X = K \left[ \frac{y}{1-y} \right]^{1/n}$$

donde X = dilución de complemento

K = constante

n = 0.2

y = % de lisis

La determinación de complemento en LBA concentrado se realizó como se describió anteriormente para suero normal.

La identificación de  $C_3$  en suero y LBA se hizo por inmunodifusión (43); el suero anti- $C_3$  de rata fue proporcionado por el Departamento de Patología de I.N.C.I.Ch. (ver apéndice).

Se trabajó con proteína de LBA liofilizada después de resuspender 6.8 mg de proteína en 100  $\mu$ l de medio amortiguador, lográndose obtener una proteína aproximadamente 200 veces más concentrada con respecto a la concentración originalmente empleada de 1.2 mg/ml. Se probaron diluciones seriadas de LBA y suero para llenar los pozos; el pozo central se llenó con el suero anti- $C_3$  y se leyeron los resultados como bandas de precipitación después de 18 a 24 horas.

#### D. ACTIVACION "IN VITRO" DE SUERO Y LBA EN PRESENCIA DE POLVOS INORGANICOS.

Se empleó al asbesto blanco o crisótilo como punto de referencia de polvo inorgánico ya que como se menciona antes, activa al complemento sérico por vía alterna y se asocia con patologías pulmonares (49, 61). Las dimensiones físicas de las fibras del asbesto (obtenido de Jeffrey Mine, Quebec, Canada), han sido bien caracterizadas y tienen una longitud promedio aproximado de 7  $\mu$ m y 0.02  $\mu$ m de diámetro (44).

Como problemas se trabajaron al cuarzo (5  $\mu$ m de diámetro) y -

el polvo de Mexicali con el objeto de intentar clarificar los posibles mecanismos quimiotácticos que participan en la respuesta temprana después de su inhalación. El tamaño promedio de las partículas de polvo de Mexicali empleadas es de  $3.5 \mu\text{m}$  (41, 64).

Para llevar a cabo la activación del complemento "in vitro" por polvos inorgánicos en LBA, se puso en contacto 1 ml de la proteína del lavado resuspendida con los diferentes polvos inorgánicos: asbesto blanco o crisótilo, zimosán A (ver anexo), polvo de Mexicali y cuarzo, así como un control sin polvo (LN).

Las cantidades de polvos inorgánicos empleados para activar al LBA se estandarizaron, ya que en la bibliografía se citan concentraciones adecuadas sólo para trabajar con suero. Así fue necesario realizar una curva de concentración óptima de polvos. Para la activación de LBA se emplearon 1, 5 y 10 mg/ml de zimosán A para conocer la concentración óptima del control positivo y 5, 10 y 25 mg/ml de crisótilo, con el fin de estandarizar las concentraciones de los polvos problema a emplear (cuarzo y polvo de Mexicali). Más adelante se explicará detalladamente la manera en que se evaluaron las concentraciones óptimas de los polvos (sección F).

Las concentraciones empleadas, tanto para los experimentos de quimiotaxis como para la determinación de complemento en LBA, fueron de 5 mg/ml para crisótilo, cuarzo y polvo de Mexicali, en tanto que de zimosán se empleó una concentración de 1 mg/ml.

La activación se efectuó poniendo en contacto la concentración antes mencionada de los polvos inorgánicos con el LBA, inclu-

bando durante 30 minutos a 37°C con agitación cada 10 minutos, período después del cual se procedió a centrifugar a 250 X g durante 10 minutos para eliminar los polvos. El sobrenadante se guardó para usarse posteriormente como proteína activada.

Para los experimentos de quimiotaxis, el sobrenadante se incubó durante 30 minutos a 56°C para evitar cualquier activación inespecífica del complemento que pudiera llevarse a cabo "in situ" (en la cámara de quimiotaxis) durante la realización del experimento.

Para la determinación de complemento por el método de Mayer, se omitió la segunda incubación para evitar la deplementación del lavado.

La activación de complemento se efectuó con la proteína resuspendida en RPMI 1640 (medio amortiguador) que contiene iones calcio y magnesio en concentraciones 0.4mM y 0.2mM respectivamente.

El suero se activó, incubando durante 30 minutos a 37°C con agitación cada 10 minutos en contacto con crisólito (SAC), polvo de Mexicali (SAPM), y cuarzo (SAS) en una concentración de 25 mg/ml en tanto que el zimósán (SAZ) se activó con 10 mg/ml (suficiente para saturar el sistema) (61).

Una vez activado el suero se centrifugó a 250 X g/ 10 minutos para eliminar a los polvos, y se procedió a efectuar la determinación de complemento en los diferentes sueros activados, así como en el suero control (SN) incubado y mantenido en las mismas condiciones que los demás, pero sin la presencia de ningún polvo inorgánico. Este control negativo sirvió para conocer la cantidad de --

complemento sérico de las ratas empleadas y poder establecer de manera indirecta, si las ratas empleadas padecían alguna enfermedad que pudiera estar consumiendo complemento sérico.

E. DETERMINACION DEL COMPLEMENTO HEMOLITICO EN SUERO Y LBA -  
ACTIVADOS POR POLVOS INORGANICOS.

En los sueros de rata activados con los polvos inorgánicos (crisólito, zimosán A, polvo de Mexicali y cuarzo), se determinó el complemento por el método de Mayer en las mismas condiciones antes descritas (sección C). La determinación del complemento en LBA concentrado previamente activado "in vitro" por polvos inorgánicos se hizo también por el método de Mayer. Después de resuspender la proteína liofilizada en el medio amortiguador RPMI 1640 más HEPES y albúmina sérica bovina hasta tener una concentración final de 1.2 mg/ml.

F. QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR LBA ACTIVADO POR POLVOS INORGANICOS.

La respuesta quimiotáctica de los macrófagos puede ser evaluada "in vitro" mediante la migración de macrófagos a través de fil



tros Nucleopore (de policarbonato con poros de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro), - en respuesta a un estímulo químico. Este método requiere el empleo de las cámaras de Boyden modificadas (54).

La sustancia en que se quiere probar los efectos quimiotácticos se pone en la parte inferior de la cámara, en la parte intermedia se coloca el filtro Nucleopore y en la parte superior, las células que nos permitirán evaluar el fenómeno (\*),

La migración de las células a través del filtro, se cuantifica por la observación directa de las células mononucleares contadas en 20 CAMPS (campos predeterminados y observados a 100 X).

Se colocaron en la parte inferior de las cámaras de Boyden - 105  $\mu\text{l}$  de LBA activado de cada uno de los polvos (crisólito, polvo de Mexicali, cuarzo y zimosán) así como, controles de LN y de medio amortiguador para quimiotaxis.

Posteriormente, se colocó el filtro entre los compartimentos inferior y superior de la cámara de quimiotaxis y finalmente, se colocó en la parte superior de la cámara 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular que contenía  $1.5 \times 10^6$  macrófagos/ml. Las cámaras se incubaron durante 3 horas a 37°C en un ambiente con CO<sub>2</sub> al 5%.

Terminado el tiempo de incubación, se quitaron los filtros y

(\*) Nota: A todas las células pulmonares empleadas en los experimentos de quimiotaxis, se efectuó una evaluación previa consistente en un conteo celular, tinción vital, tinción citofluorescencia, y cuenta diferencial (ver apéndice).

se colocaron en una canastilla para fijarlos y teñirlos; se fijaron con metanol durante un minuto y se teñieron con Eosina y Azure.

Los filtros se colocaron sobre cubreobjetos y las células de la parte superior del filtro (células que no migraron) se eliminaron con un hisopo humedecido con SSI. Una vez secos los filtros se montaron en portaobjetos empleando resina.

Los macrófagos que migran de la parte superior del filtro a la parte inferior del mismo, se contaron al microscopio de luz en 20 campos con 100 X (20 CAMPOS).

La obtención de macrófagos alveolares para medir la quimiotaxis, se hizo como se describió anteriormente. En este caso, durante el primer paso de centrifugación se recuperaron las células, y se lavaron 2 veces con SSAF centrifugando a 250 X g durante 10 minutos resuspendiendo finalmente en medio amortiguador RPMI 1640, HEPES 10 mM y albúmina sérica bovina al 2%.

Se ajustó a una concentración final de  $1.5 \times 10^6$  macrófagos por ml.

Para llevar a cabo la quimiotaxis de LBA concentrado, activa do "in vitro" por polvos inorgánicos, se realizó una curva dosis-respuesta para conocer la concentración óptima de polvos inorgánicos a emplear para la activación del LBA concentrado. Se probó mediante quimiotaxis de concentraciones variables de (un polvo control positivo), crisótilo: 5, 10 y 25 mg/ml y zimósán a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml. La activación se efectuó como se describió anteriormente (sección D) y la quimiotaxis en las mismas.

condiciones ya mencionadas en esta misma sección.

En cada uno de los experimentos de quimiotaxis realizados se incluyeron dos controles. Un control positivo que consistió en el empleo de suero de rata normal activado con zimosán (10 mg/ml) diluido al 10% con medio amortiguador y un control negativo en que sólo se usó medio amortiguador para quimiotaxis. Ambos controles fueron puestos en la parte inferior de la cámara de Boyden como sustancias a probar. En todos los experimentos se restó el número de células que migraron con el control negativo. Cada experimento se efectuó por duplicado en cada punto.

Una vez que se optimizó la concentración de polvos inorgánicos a emplear, probando concentraciones variables de los polvos como se describió antes; se determinó emplear 5 mg/ml para crisótilo, cuarzo y polvo de Mexicali y 1 mg/ml para zimosán, se procedió a la activación del LBA.

Las diluciones en la quimiotaxis fueron 100, 50 y 25% incluyendo al lavado normal.

Para confirmar que los resultados obtenidos, no se debieron a migración al azar o quimioquinesis, se efectuaron pruebas en las que se modificaron o igualaron los gradientes de LBA activado, de la siguiente manera:

Se realizó una inversión de gradiente de concentración, colocando la sustancia a probar junto con la suspensión celular en la parte superior de la cámara de quimiotaxis, en tanto que en la parte inferior sólo se colocó medio amortiguador.

Por otra parte se obtuvo un gradiente de concentración igual en ambos compartimentos de la cámara, poniendo sustancia a probar arriba y abajo de la cámara de Boyden modificada.

Con el fin de poder establecer si la activación del complemento por los polvos inorgánicos se efectuaba por vía alterna o por vía clásica, se hicieron experimentos de quimiotaxis en presencia y ausencia de ácido etilén diamino tetracético (EDTA), y ácido etilén glicol bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N-N'-tetracético (EGTA) con LBA activado al 50%.

El EDTA se empleó a una concentración de 10 mM como inhibidor de las vías de activación de complemento tanto clásica como alterna. El EGTA se usó a una concentración de 10 mM, como inhibidor selectivo de la vía clásica de activación de complemento.

#### G. PRESENCIA DE ENDOTOXINA.

La detección de endotoxina bacteriana se efectuó mediante el empleo de un equipo de reactivos de Sigma (ver anexo) E-Toxato en agua destilada, SSAF y LBA concentrado.

El equipo de reactivos incluye un preparado a partir de un lisado de amebocitos circulantes de la jaiba Limulus polyphemus. Cuando este preparado se pone en contacto con cantidades mínimas de endotoxina (lipopolisacárido de pared celular de bacterias gram

negativas), el lisado aumenta su opacidad y viscosidad e incluso gelifica, dependiendo de la concentración de endotoxina presente.

El mecanismo de esta reacción no ha sido completamente clarificado, sin embargo, se piensa que es un proceso análogo al de la coagulación en la sangre de mamíferos (54).

Debido a que cantidades extremadamente pequeñas de endotoxina pueden inducir la gelificación, todo el material empleado para la determinación se procesó para tenerlo libre de endotoxina, para lo cual todo el material de vidrio y de plástico se sumergió durante una noche con solución salina al 1% de detergente alcalino "limpiador E-toxato" (ver anexo) y se enjuagó varias veces con agua corriente y agua destilada. El material de vidrio además se sometió a 175°C durante 4 horas.

Debido a que la endotoxina es capaz de activar complemento por vía alterna al igual que zimosañ, todo el material que se empleó para la obtención y manejo de LBA, se trató para dejarlo libre de endotoxina (ver apéndice) y de esta manera evitar que se realizara una activación inespecífica del complemento en el sistema y que se pudiera enmascarar la activación real por los polvos inorgánicos.

## H. ESTADISTICA

Las medias o promedios fueron calculadas en todos los datos - obtenidos para lograr que los datos presentados fueran los más representativos. Los resultados reportados son el promedio de experimentos hechos por lo-menos 3 veces.

Para complemento, se promediaron las  $UCH_{50}$  obtenidas de las - tres diluciones practicadas del método, corrigiendo el factor de - dilución y a su vez, con estos datos, se calculó la media que se - presenta en tablas.

Se practicaron pruebas de "t" para los experimentos de complemento y quimiotaxis para  $\chi_2$  (prueba de "t" de 2 colas), tomando como valor significativo  $p < 0.05$ , siendo el valor crítico de  $t = 2.776$ .

#### **IV RESULTADOS**

#### A. IDENTIFICACION DE COMPLEMENTO EN SUERO Y LBA.

La determinación de complemento se efectuó por el método de Mayer en suero previamente activado "in vitro" con polvos inorgánicos y diluido 1:75. La medición se reporta en  $UCH_{50}$ , teniendo como valor más alto de hemólisis el de suero normal: que fue considerado el valor de referencia de complemento sérico en rata - (17  $UCH_{50}$ ).

Se probó un control positivo con zimosán (10 mg/ml de suero) el cual saturó el sistema. Todo el complemento presente fue activado, ya que en ningún caso, se detectó lectura de hemólisis, al observar la absorción de la hemoglobina a 540 nm.

De acuerdo con los datos obtenidos, se encontró que el crisólito (10  $UCH_{50}$ ) y el polvo de Mexicali (11  $UCH_{50}$ ), activan complemento sérico (ver figura 1) con base a los valores de hemólisis observados y comparados con respecto a suero normal (SN). En tanto que la diferencia entre el cuarzo (13  $UCH_{50}$ ) y suero normal no resultó ser significativa, es decir, el cuarzo no activa al complemento sérico (ver tabla 1).



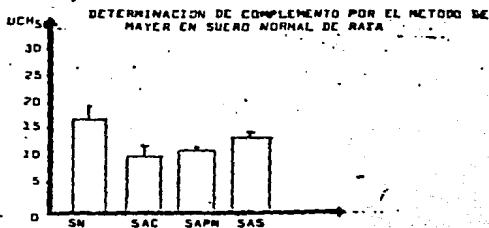


FIGURA 1:

Los valores que se presentan en la gráfica son promedio de tres experimentos, se grafica la desviación estándar. Se emplearon 10ng/ml de zimosán en suero como control positivo; todo el complemento se activó y no se detectó lectura de hemólisis.

TABLA 1

DETERMINACION DE COMPLEMENTO POR EL METODO DE  
MAYER EN SUERO NORMAL DE RATA

Problema	UCH <sub>50</sub>	t para $\alpha_2$	significancia
SM	1732.3		
SAC	1071.3	4.415	p<0.02
SAS	-	-	-
SAPN	1120.1	4.314	p<0.05
SAS	1321	7.253	no significativo.

La activación de complemento se efectuó en presencia de los polvos inorgánicos previamente a la determinación de complemento. Los valores de UCH<sub>50</sub> son el resultado del promedio de 3 experimentos, en cada uno, se practicaron 3 diluciones del extracto. El valor crítico de t para  $\alpha_2$  es 7.776.

Para la determinación de complemento en LBA concentrado activado previamente "in vitro" por polvos inorgánicos realizada por el método de Mayer, se encontró que todos los polvos inorgánicos empleados activan al complemento que se encuentra presente en el lavado bronquio-alveolar de rata. El comportamiento seguido por los polvos fue el siguiente: crisólito 0.20 UCH<sub>50</sub> y polvo de Mexicali y cuarzo 0.19 UCH<sub>50</sub> (ver figura 2).

Todos los datos fueron significativos con respecto a lavado normal (0.24 UCH<sub>50</sub>), único control negativo de activación de complemento, (tabla 2). Con zimosán se obtuvieron 0.17 UCH<sub>50</sub> (la concentración de zimosán empleado fue menor a la que se utilizó con el suero).

Considerando que en suero normal (SN) se obtuvieron 17 UCH<sub>50</sub> y en lavado normal (LN) 0.24 UCH<sub>50</sub>, se puede establecer un cociente entre ambos datos que nos permita hacer una estimación de la cantidad de complemento sérico con respecto al complemento presente en LBA: Este es aproximadamente 70 veces inferior con respecto al del suero, tomando en cuenta que el LBA a su vez está concentrado de 15 a 17 veces.

Una manera de comprobar la estimación antes citada, es la dilución del suero empleada (1:75) para lograr una hemólisis similar a la que dió el LBA con el método de Mayer.

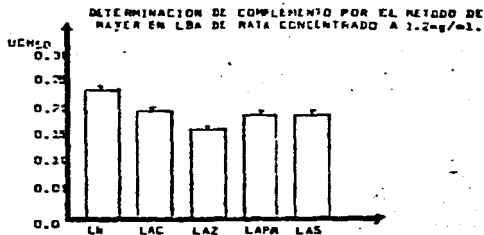


FIGURA 2:

Los datos de UCM<sub>50</sub> que se presentan son el resultado del promedio de tres experimentos cada uno de los cuales se practicó con 3 diluciones del método. Se graficó la desviación estándar.

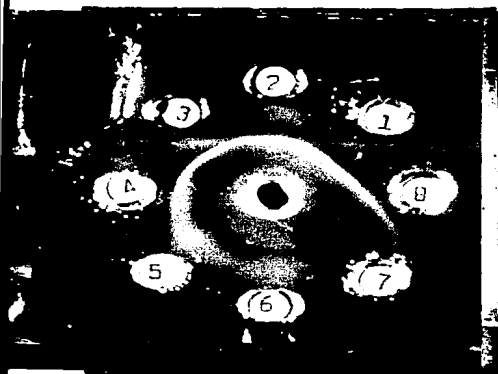
TABLA 2

DETERMINACION DE COMPLEMENTO POR EL METODO DE  
MAYER EN LBA DE RATA CONCENTRADO A 1.2mg/ml.

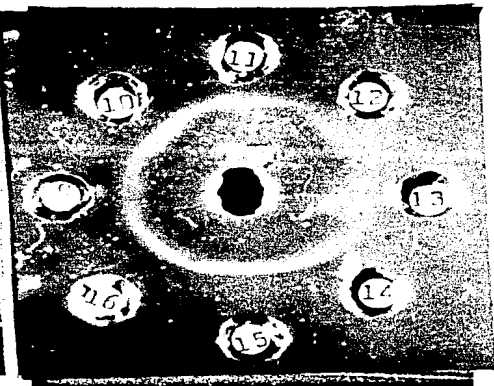
Problema	UCM <sub>50</sub>	t para $\alpha_2$	significancia
LN	0.24±0.01		
LAC	0.20±0.02	3.098	p<0.05
LAZ	0.17±0.03	3.834	p<0.02
LAPR	0.19±0.02	3.873	p<0.02
LAS	0.19±0.02	3.673	p<0.02

La activación "in vitro" con polvos inorgánicos y LBA concentrado se llevó a cabo previamente a la determinación de complemento. Los valores para la t de Student se efectuaron para dos colas ( $\alpha_2$ ) siendo el valor crítico de t 2.776.

En cuanto a los resultados de la inmunodifusión para diluciones de suero de rata, se encontró identidad en las bandas de precipitación de suero normal (SN) y lavado normal (LN) concentrado. La última banda de precipitación se observó en la dilución 1:64 del suero.



- |   |    |       |
|---|----|-------|
| 1 | SN | 1:1   |
| 2 | SN | 1:4   |
| 3 | SN | 1:8   |
| 4 | SN | 1:16  |
| 5 | SN | 1:32  |
| 6 | SN | 1:64  |
| 7 | SN | 1:128 |
| 8 | LN | 1:1   |



- |    |    |      |
|----|----|------|
| 9  | LN | 1:1  |
| 10 | LN | 1:2  |
| 11 | LN | 1:4  |
| 12 | LN | 1:8  |
| 13 | LN | 1:16 |
| 14 | LN | 1:4  |
| 15 | SN | 1:64 |
| 16 | LN | 1:1  |

En la inmunodifusión para LBA concentrado, la última banda de precipitación se encontró en la dilución 1:4 del concentrado de proteína.

Debido a que la proteína liofilizada fue resuspendida en medio amortiguador adicionado de albúmina se efectuó una determinación de proteínas (Lowry) para conocer el contenido de proteína sérica total y proteína de lavado pulmonar, restando la cantidad de albúmina presente en el medio amortiguador.

Lo anterior se hizo con la finalidad de poder hacer una estimación del porcentaje de  $C_3$  presente tanto en LBA como en suero normal y poder correlacionar al complemento sérico con el del LBA, tal como se hizo cuando se determinó complemento por el método de Mayer.

En el suero se detectaron 7 g/dl de proteína sérica y en LBA 5 mg/ml de proteína (restando albúmina).

Considerando que el 1.5% de proteína total en suero es  $C_3$  (32), se puede asumir que hay 1.2 mg/ml de  $C_3$  en suero y además se puede establecer estimativamente que hay una equivalencia de  $C_3$  tanto en suero como en lavado después de concentrar LBA tantas veces como fue necesario para establecer la homología de  $C_3$  sérico y de secreción pulmonar (aproximadamente de 15 a 17 veces).

## B.- QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR LBA ACTIVADO POR POLVOS INORGANICOS.

Debido a que los macrófagos alveolares obtenidos del lavado bronquio-alveolar de las ratas se emplearon para los estudios de quimiotaxis con suero y con lavado activado, se realizó una evaluación de ellos.

Siempre se trabajó con células en un intervalo de viabilidad del 96-98%. 85% del total de células empleadas eran mononucleares estearasa positivos y el 15% restante estearasa negativos.

Este 15% correspondió a linfocitos, de acuerdo a los datos obtenidos por medio de las cuentas diferenciales (ver tablas tres).

En cuanto a los datos de la cuenta diferencial, siempre se encontró del 87-96% de mononucleares, del 0-1% polimorfonucleares y del 3-13% linfocitos. Como puede verse los datos concuerdan bien con las determinaciones de estearasa inespecífica.

TABLA 3

## EVALUACION DE CELULAS PULMONARES

Método de Evaluación	% de células
Viabilidad	96-98
Tinción citoquímica (estearasa inespecífica)	85 mononucleares estearasa(+)
	15 estearasa(-)
Cuenta Diferencial:	
Mononucleares	87-96
Polimorfonucleares	0-1
Linfocitos	3-13

Para determinar la concentración óptima de polvos inorgánicos en el sistema LBA concentrado (1.2 mg/ml), se probaron diferentes concentraciones de un polvo control positivo (zimosán a 1, 5 y 10 mg/ml).

Se encontró que para zimosán la concentración de 1 mg/ml era la que daba una mayor respuesta quimiotáctica (85 células/20 CAMPS), a concentraciones superiores, decrecía la actividad migratoria de los macrófagos (35 células/20 CAMPS para 5 mg/ml y 23 células/20 CAMPS para 10 mg/ml). Esto se observa en la figura 3.

En cuanto al crisótilo, la concentración de 5 mg/ml dió la mayor respuesta migratoria celular (80 células/20 CAMPS), teniendo nuevamente un decremento a concentraciones más altas (tabla 4), (50 células/20 CAMPS para 10 mg/ml y 30 células /20 CAMPS para 25 mg/ml. Se practicó un control con lavado normal (LN) y se observó una migración de 10 células/20 CAMPS. En el resto de los experimentos del presente trabajo se emplearon las concentraciones óptimas.



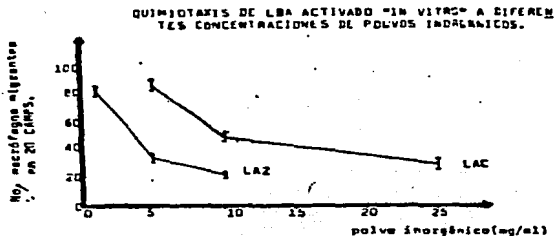


FIGURA 3:

Se realizó una curva dosis-respuesta para optimizar la concentración de un polvo problema y del control positivo; sí-món.

TABLA 4

**QUIMIOSTATIS DE LBA ACTIVADO "IN VITRO" A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLVOS INORGANICOS.**

Problema	No. células migrantes en 70 CAMPS.
LAZ 1mg/ml	85
LAZ 5mg/ml	35
LAZ 10mg/ml	23
LAC 5mg/ml	88
LAC 10mg/ml	50
LAC 25mg/ml	30
LN	10

Se realizó una curva dosis-respuesta para optimizar la concentración de un polvo problema y del control positivo; sí-món. El número de macrófagos migrantes en 70 - CAMPS que se presentan son el resultado de un experimento por duplicado.

El control negativo del experimento, se usó de todos los datos; Del control positivo, suero activado con sí-món 10% dio 1200 células en 70 CAMPS.

Para efectuar la curva dosis-respuesta, una vez optimizada la concentración de polvo para activar el complemento del sistema, se procedió a activar el LBA con 1 mg/ml de zimósán y 5 mg/ml de los otros polvos y se probó el LBA activado al 100%, 50% y 25% ya que se sabe que la respuesta quimiotáctica no es lineal.

La concentración óptima de trabajo fue del 50% ya que en este punto se encontró el mayor número de células migrantes (figura 4, tabla 5). Los datos encontrados con esta concentración del 50% fueron: 190 células/20 CAMPS para zimósán, 160 células/20 CAMPS para crisótilo, 158 células /20 CAMPS para polvo de Mexicali, 121 células por 20 CAMPS para cuarzo y 14 células en 20 CAMPS para lavado normal(LN).

La diferencia en el número de células migrantes inducidas por LBA activado, en relación a las del lavado normal LN fue significativa (tabla 6, figura 5).

En las concentraciones de 25% y 100% se obtuvo un menor número de células migrantes, con respecto a los datos obtenidos con la concentración óptima del 50%. En el resto del trabajo se empleó ésta como dilución única.

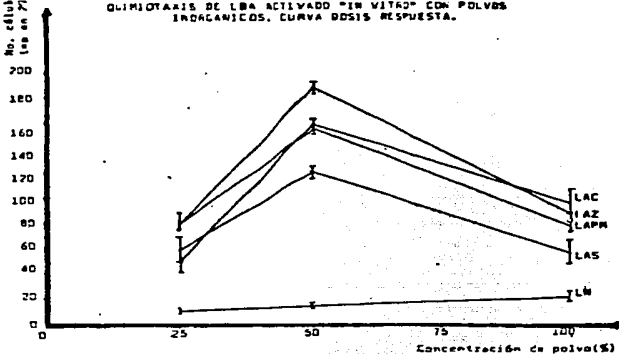
No. células migran-  
tes en 72 hpm.QUIMIOTAXIS DE LBA ACTIVADO "IN VITRO" CON POLVOS  
INORGANICOS. CURVA DOSIS-RESPUESTA.

FIGURA 4:

Curva dosis- respuesta quimiotáctica a diferentes concentraciones de polvos inorgánicos. Se graficó el promedio de 5 experimentos; en cada uno el esportiguador empleado para la quimiotaxis (control negativo del experimento) se restó de todos los datos. En suero activado con sílica (1%) migraron 1806 células.

TABLA 5

QUIMIOTAXIS DE LBA ACTIVADO "IN VITRO" CON POLVOS  
INORGANICOS. CURVA DOSIS-RESPUESTA.

Problemas	No. macrófagos migran- tes en 72 hpm.
LM 100%	23:10
LM 50%	14:11
LM 25%	11:16
LAC 100%	99:20
LAC 50%	160:10
LAC 25%	50:10
LAZ 100%	90:5
LAZ 50%	190:8
LAZ 25%	80:40
LAPM 100%	80:10
LAPM 50%	150:10
LAPM 25%	83:20
LAS 100%	58:20
LAS 50%	121:10
LAS 25%	99:23

Para la optimización de número de células migrantes a una respuesta quimiotáctica se probaron diferentes concentraciones de polvos inorgánicos. El número de células presentadas es el promedio de 5 experimentos; cada uno se realizó por duplicado.

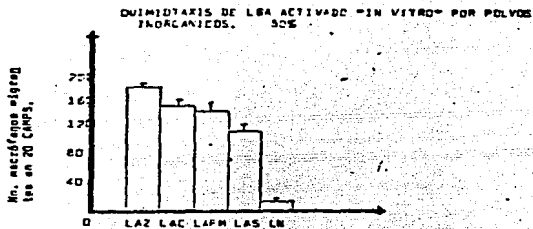


FIGURA 5:

Se muestra el punto de la curva dosis-respuesta con mayor respuesta quimiotáctica provocada de 5 experimentos. Se grafica la desviación estándar.

TABLA 6

QUIMIOXTAXIS DE LEA ACTIVADO "IN VITRO" POR POLVOS INORGANICOS. 50%

Problema	No. células migrantes en 20 cámaras ± desviación estándar	t para $\alpha_2$	significancia
LAZ 50%	190±9	6.665	p<0.005
LAC 50%	160±10	3.559	p<0.02
LAPM 50%	158±10	3.509	p<0.02
LAS 50%	121±10	2.780	p<0.05
LN 50%	14±1	-	-

Los resultados que se presentan son el promedio de cinco experimentos, cada experimento consta de un duplicado de cada problema a la concentración estandar; se grafica la desviación estándar.

El valor crítico de t para la prueba de 2 tólos fue 2.776.

Para confirmar la migración por quimiotaxis de los macrófagos, el experimento se llevó a efecto como ya se describió en la sección F comprobándose que efectivamente los datos obtenidos eran resultado de la acción quimiotáctica sobre los macrófagos y no de una migración al azar o quimincinesis (figura 6).

Como se corroboró (tabla 7) prácticamente no hubo migración en los experimentos con gradiente de concentración invertido o cuando se igualó el gradiente de concentración en ambos compartimentos de la cámara de Boyden.

En los casos en que se observó algo de migración, el número de células que migraron siempre fue inferior al del control de lavado normal (LN).

La migración observada en los experimentos contra gradiente fue en condiciones de trabajo: LN 23 células/20 CAMPS, LAC 198 células/20 CAMPS, LAZ 227 células/20 CAMPS, LAPM 146 células/20 CAMPS y LAS 126 células/20 CAMPS.

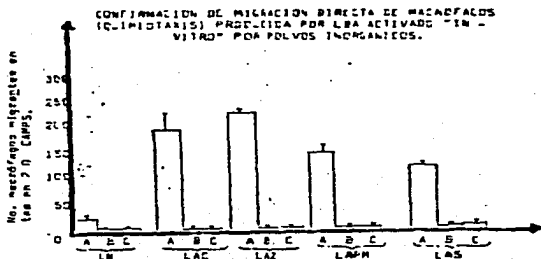


FIGURA 6:

Para confirmación de la quimiotaxis, se igualaron e invirtieron los gradientes de concentración en la cámara de quimiotaxis. El control negativo del experimento, se realizó de todas las datos obtenidos, el número de macrófagos que migraron en 20 CAMPS en el control positivo del experimento, fueron activados por el mismo al 10%, fue de 1075 células.

A B C Concentración en % de LBA en  
 Arriba 50% 0% 50% ; la cámara de quimiotaxis.  
 Abajo 0% 50% 50%

TABLA 7

CONFIRMACION DE MIGRACION DIRECTA DE MACROFAGOS  
(QUIMICTAXIS) PRODUCIDA POR POLVOS INORGANICOS  
EN LBA ACTIVADO "IN VITRO".

Problema	Abajo	Arriba	No. macrófagos migran- tes en 20 CAMPS.
LW	50%	0%	23
LAC	50%	0%	190
LAZ	50%	0%	227
LAPM	50%	0%	145
LAS	50%	0%	126
LW	0%	50%	0
LAC	0%	50%	0
LAZ	0%	50%	0
LAPM	0%	50%	0
LAS	0%	50%	3
LW	50%	50%	3
LAC	50%	50%	3
LAZ	50%	50%	4
LAPM	50%	50%	1
LAS	50%	50%	6

Para comprobar que los datos no eran debidos a un quimiotaxis, se efectuaron a la concentración óptima pruebas probando con concentraciones iguales e invirtiendo el gradiente de concentración.

El número de macrófagos migrantes en 20 CAMPS, son el resultado del promedio de 2 experimentos.

Para comprobar la influencia de la presencia de inhibidores de las vías clásica y alterna en la activación de complemento por la realización de este experimento de quimiotaxis se confirmó que la activación del complemento por zimosán y crisótilo, se lleve a cabo por la vía alterna, ya que la inhibición realizada por el EGTA (inhibidor selectivo de la vía clásica), no resultó significativa, en tanto que la inhibición por EDTA (inhibidor de ambas vías) sí fue significativa, (figura 7).

En el caso del lavado activado con zimosán, de las 261 células que migraron inicialmente hubo una inhibición en la migración a 196 células por EGTA (no significativo) y a 59 células/20 CAMPS con EDTA. Para crisótilo la inhibición fue de 247 macrófagos a 186 con EGTA (no significativo) y a 41 células/20 CAMPS con EDTA.

Se comprobó que el polvo de Mexicali, se comportó igual que los polvos antes mencionados, activando el complemento por la vía alterna (tabla 8). La inhibición en la migración de macrófagos con valores iniciales de 186 células se redujo a 148 en presencia de EGTA (diferencia no significativa), en tanto que con EDTA, sólo migraron 22 células.

En el caso del cuarzo, no se observó una inhibición significativa en la migración, ni por EDTA (reducción a 69 células) ni por EGTA (61 células), de un número inicial de 169 células/20 CAMPS.

QUIMIOTAXIS DE LBA CONCENTRADO TRATADO "IN VITRO" CON POLVOS INORGANICOS EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LAS VIAS DE ACTIVACION DE COMPLEMENTO CLASICA Y ALTERNA (EGTA Y EDTA).

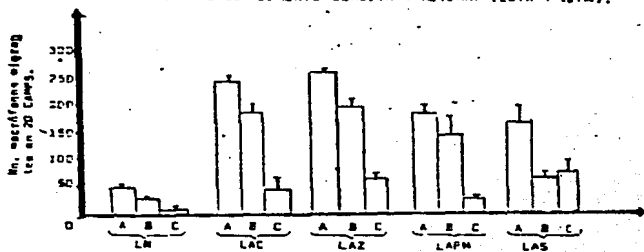


FIGURA 7:

Los datos graficados son el resultado de 3 experimentos, cada uno consta de un duplicado de los problemas. En cada experimento se controla con 2 fuentes control: el negativo sustituido de su investigador, se resta de todos los datos y el positivo de su activador también el 10% de un número de macrófagos migrantes en 20 CAMPS de 1111.

A Proteína de LBA al 50%

B Proteína de LBA al 50% activada "in vitro" en presencia de EGTA

C Proteína de LBA al 50% activada "in vitro" en presencia de EDTA

TABLA 8

QUIMIOTAXIS DE LBA CONCENTRADO TRATADO "IN VITRO" CON POLVOS INORGANICOS EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LAS VIAS DE ACTIVACION DE COMPLEMENTO CLASICA Y ALTERNA (EGTA Y EDTA).

PROBLEMA	Nc. células migran tes en 20 CAMPS.	t pareo	significancia
LN 50%	47 ± 3		
LN 50% EGTA 10mM	26 ± 5	1.520	no significativo
LN 50% EDTA 10mM	14 ± 14	3.249	p<0.02
LAC50%	247 ± 7		
LAC50% EGTA 10mM	186 ± 10	1.007	no significativo
LAC50% EDTA 10mM	41 ± 10	3.404	p<0.02
LAZ50%	261 ± 1		
LAZ50% EGTA 10mM	196 ± 12	1.103	no significativo
LAZ50% EDTA 10mM	59 ± 10	4.974	p<0.01
LAPP50%	186 ± 18		
LAPP50% EGTA10mM	148 ± 18	0.037	no significativo
LAPP50% EDTA10mM	27 ± 3	7.778	p<0.05
LAS 50%	169 ± 28		
LAS 50% EGTA10mM	61 ± 11	0.294	no significativo
LAS 50% EDTA10mM	69 ± 24	0.209	no significativo

El número de macrófagos migrantes contados en 20CAMPS son el resultado del promedio de 3 experimentos cada uno consta de un duplicado de los diferentes puntos problema. Los valores para la prueba de t pareo, se consideraron tomando como valor crítico de t 7.776.



**C. PRESENCIA DE ENDOTOXINA.**

De acuerdo a las pruebas realizadas, no se detectó endotoxina bacteriana en agua destilada empleada para los experimentos, LBA-concentrado y SSAF.

## V DISCUSION DE RESULTADOS.

Por estudios realizados con asbesto (8), cuarzo (7), y polvo de Mexicali (41, 47), se sabe que las lesiones pulmonares inducidas por estos polvos inorgánicos, se inician con el depósito de las partículas a nivel de la primera bifurcación de los conductos alveolares. Es en este sitio donde se inicia la lesión con una migración y acumulación de macrófagos.

En el caso del asbesto, el estímulo quimiotáctico que media esta respuesta, depende de la activación del complemento por las fibras de asbesto (17, 62), sin embargo, se desconoce si esto se aplica a los otros polvos.

Considerando lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue el estudio de la capacidad del cuarzo y del polvo de Mexicali para activar el complemento en suero y en secreción pulmonar (LBA), con la finalidad de establecer si los mecanismos de respuesta quimiotáctica temprana se pueden explicar por medio de este fenómeno.

Para poder llevar a cabo lo anteriormente expuesto, primero se cuantificó el complemento en el suero de las ratas por ser los animales con que se trabajó y para establecer si dicho complemento era susceptible de ser activado "in vitro" por los polvos inorgánicos. Para efectuar la determinación de complemento en suero se empleó -- además del método de Mayer la técnica de inmunodifusión de Duchterlony, empleando un suero anti-C<sub>3</sub> de rata.

Una vez establecida la cantidad de complemento sérico se procedió a probar su posible activación "in vitro" por polvos inorgáni -

cos. Se encontró que el complemento si fue activado por zimosán, agbesto y polvo de Mexicali. Esto ya había sido reportado para el zimosán y el asbesto crisótilo, la activación ocurre por la vía alterna (18, 49). En el caso del cuarzo, se encontró que éste no activó al complemento sérico.

De acuerdo con el plan de trabajo se intentó llevar a cabo la identificación del complemento en LBA concentrado de 15 a 17 veces y en este caso, se identificó la presencia de complemento en concentración 70 veces menor a la encontrada en suero. Al igual que con el suero, una vez identificado en complemento se intentó su activación con los diferentes polvos inorgánicos. Los resultados demostraron que todos los polvos inorgánicos fueron capaces de activarlo, incluyendo al cuarzo. Esto representa un hallazgo interesante que se comentará más adelante.

Además de la identificación de complemento en suero y LBA, se probó en bioensayo la capacidad quimiotáctica estimulada por cada uno de los polvos; observándose una buena correlación.

Estos resultados permiten concluir que diferentes polvos inorgánicos tienen la capacidad de activar el complemento presente en la secreción pulmonar (LBA) y que por lo tanto, su depósito en el pulmón resultaría en la generación de estímulos quimiotácticos que inicien una respuesta macrofágica. Este sistema "in vitro" permite demostrar el papel directo que ejerce la partícula sobre el lavado, sin que interfieran fenómenos de trasudación de proteínas séricas al alveolo, por una lesión directa de los polvos a la pared alveo-

lar (47).

El estudio de los macrófagos es de gran trascendencia debido a que éste constituye un mecanismo de eliminación de partículas extrañas del parénquima pulmonar. Por medio de este mecanismo se eliminan el 60% de las partículas. Cuando se trata de partículas inertes, este mecanismo elimina la sobrecarga de partículas atranadas en el pulmón. Sin embargo, todavía no está claro el papel que juegan los macrófagos que entran en contacto con las partículas patógenas y/o que no son eliminadas del pulmón, para producir enfermedad.

No obstante, en la actualidad se acepta que los macrófagos juegan un papel clave en los padecimientos por inhalación de partículas inorgánicas (68). El hecho de que los macrófagos migran hacia el sitio de depósito de las partículas, hizo pensar en la existencia de un factor quimiotáctico para macrófagos relacionado directamente con el depósito de éstas. Este fenómeno fue explorado y se supo que las partículas no tienen capacidad quimiotáctica "per se" (7, 8). No obstante había evidencia de que el asbesto era capaz de activar complemento y por consecuencia, liberar factores quimiotácticos (49).

Esta información hizo que se centrara la atención en los factores quimiotácticos derivados de la activación del complemento, ya que se sabe que  $C_5a$  cumple esta función.

Aprovechando este fenómeno se emplearon métodos para detección de complemento hemolítico (método de Mayer), lo cual implica la activación del complemento hasta  $C_9$ ; liberando por consecuencia fragmen

tos como  $C_{5a}$ . También se empleó el método de inmunodifusión de Ouchterlony para cuantificar a  $C_3$ , debido a que éste es el fragmento del complemento más fácil de detectar y el que se encuentra en ambas vías de activación.

Nuestros resultados de inmunodifusión demuestran homología en los fragmentos precipitados con suero anti- $C_3$  de rata en suero y LBA. La identificación de  $C_{5a}$  no pudo llevarse a efecto debido a que se requería de un equipo que fuera capaz de proporcionar una mayor sensibilidad como podría ser la nefelometría de rayo láser o la cuantificación por inmunoelectroforesis, para lo cual se requiere de un anticuerpo monovalente anti- $C_{5a}$  con el cual no se contó (43).

La identificación del complemento en LBA permitió que se buscara su activación por diferentes polvos inorgánicos. Se incluyó al asbesto y al zimosán como controles positivos y dos polvos problemas: el polvo de Mexicali y el cuarzo. Los resultados demuestran que todos los polvos fueron capaces de activar complemento en LBA quedando por demostrar si esta activación induce una respuesta quimiotáctica de los macrófagos como la que se esperaría en animales expuestos.

En síntesis, podría decirse que hasta aquí se ha logrado uno de los objetivos principales que era la identificación del complemento en LBA y además se corroboró que los polvos inorgánicos probados fueron capaces de activarlo "in vitro".

En la actualidad se manejan los conceptos de funciones y capacidades de los macrófagos para entender el papel de éstos en la respuesta inflamatoria. Estos conceptos implican que las interacciones de

dichas capacidades entre sí (como sería la expresión de antígenos - de clase Ia, la cantidad de  $H_2O_2$  secretado, la cantidad de fosfatasa ácida, etc.), dependerá una función específica del macrófago. - Por lo tanto la activación del macrófago implicaría una regulación - positiva o negativa de diversas capacidades que daría como resulta - do una función específica (quimiotaxis, fagocitosis, presentación - de antígenos, etc.). (57).

En este caso se midió un estímulo de activación mediada por . - complemento, como manifestación primaria de la respuesta macrofá - gica en el pulmón expuesto a polvos (18).

La quimiotaxis, es una locomoción unidireccional de las célu - las siguiendo un gradiente de concentración de alguna sustancia - químioatrayente. Al mismo tiempo existen otros 2 tipos de movilidad celular: la migración al azar, es decir, locomoción en ausencia de - cualquier estímulo migratorio conocido y la quimioquinesis, que es - una migración al azar estimulada por sustancias que aumentan la lo - comoción del macrófago, pero que no están presentes en un gradiente de concentración (54). Por lo tanto todo experimento que busca qui - miotaxis debe descartar los otros dos tipos de movilidad, incluyen - do controles de migración contra un blanco (medio amortiguador solo) e invirtiendo e igualando los gradientes de LBA y suero activados.

Los experimentos de quimiotaxis fueron realizados con macrófa - gos alveolares de rata que se obtuvieron con las siguientes carac - terísticas: la viabilidad nunca fue menor del 96%, el 85% de las cé - lulas mononucleares fueron esterasa positivas. Menos del 1% fueron

polimorfonucleares y siempre hubo intervalos inferiores al 13% de linfocitos. Esto garantiza la especificidad de una respuesta macrofágica similar a la que ocurriría "in vivo".

Dentro de la serie de experimentos de quimiotaxis, primeramente se efectuó una prueba para optimizar la concentración de los polvos inorgánicos en el sistema LBA, ya que este dato no se reporta en la bibliografía. Se probó activar al control positivo (zimosán A) a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml en LBA concentrado, mientras que la dosis óptima para activar suero es de 10 mg/ml.

De igual manera se probó la respuesta quimiotáctica a diferentes concentraciones de asbesto (5, 10 y 25 mg/ml) encontrándose la respuesta óptima migratoria de macrófagos con 5 mg/ml.

Una vez optimizada la concentración de polvos inorgánicos para detectar la respuesta quimiotáctica de los macrófagos, se efectuó una curva dosis-respuesta de acuerdo a diluciones seriadas (100%, 50% y 25%), para cada problema y control. La del 50% dió la respuesta quimiotáctica mayor para zimosán, crisólito, cuarzo y polvo de Mexicali. La respuesta quimiotáctica, en orden decreciente, fue mayor para zimosán, asbesto, polvo de Mexicali y cuarzo, resultando proporcional a lo observado por  $CH_{50}$ , es decir, zimosán fue el que activó más complemento.

En LN se observó migración de macrófagos mínima. Esta migración se puede atribuir a una pequeña activación inespecífica del complemento de origen desconocido. La ausencia de endotoxina bacteriana se pudo demostrar hasta una concentración de 0.1 ng/ml, sin embargo,



si dicha endotoxina se encontraba presente a concentraciones menores a las probadas, ésta pudiera ser la causante de la quimiotaxis observada en LN. Por otro lado no podemos descartar el papel de otras sustancias quimioatrayentes presentes en LBA, como serían los derivados del ácido araquidónico (22). La existencia de un factor quimiotáctico en LN se basa en que los macrófagos que migran siempre fueron más que los observados en el control negativo, pero siempre fueron en menor cantidad que los observados en LBA activado. Este hallazgo ha sido reportado por otros autores (61, 62) sin que haya una explicación aparente.

Se encontró que en los casos de gradiente de concentración igual e invertido no hubo migración de los macrófagos lo cual comprueba que los datos antes expuestos son resultado de una quimiotaxis verdadera. Como ya se conocía el tipo de respuesta quimiotáctica que se presentaba en cada caso de polvo problema o control (número de células migrantes contadas en 20 CAMPS), se intentó dilucidar por qué vía activaban "in vitro" al complemento en LBA los polvos inorgánicos.

Se efectuó la activación de complemento con polvos inorgánicos en presencia de inhibidores de las vías de activación del complemento clásica y alterna. Se sabe que para la activación por vía clásica a partir de  $C_1$  se requiere del ion calcio, en tanto que la activación de  $C_3B$  (por vía alterna) requiere del magnesio. Así se pueden emplear quelantes de dichos metales en forma selectiva y dilucidar la vía de activación por polvos inorgánicos del complemento en el LBA (18,49, 57).

Se usó EDTA como inhibidor de ambas vías de activación por su capacidad como ligante de calcio y magnesio, en tanto que se empleó al EGTA; como inhibidor selectivo de la vía clásica (49), ya que es un ligante preferencial de calcio. La capacidad de los ligantes para quelar a los metales está determinada por las constantes de afinidad de dichos ligantes por calcio y magnesio a pH=7 y a una temperatura de 37°C, condiciones del sistema en que se probó.

Se corroboraron los datos de que el zimósán y el asbesto activan al complemento del LBA por vía alterna (49, 52). Se encontró que el empleo de EDTA y EGTA produjo, una disminución en el número de células migrantes con todos los polvos probados, sin embargo, el estudio estadístico de los datos demostró que sólo la inhibición por EDTA fue significativa (excepto en cuarzo). Así, estos resultados - más el hecho de que la inhibición realizada por EGTA (inhibidor selectivo de la vía clásica) no fuera significativa, permite deducir que la activación se realiza por la vía alterna.

De lo anteriormente expuesto, cabe mencionar que la activación por cuarzo no fue alterada significativamente por ninguno de los inhibidores, además también resulta interesante señalar la incapacidad del cuarzo para activar complemento sérico mientras que sí lo hizo en LBA.

Aunque esto se sale del objetivo originalmente planteado para la tesis se tratarán de ofrecer algunas explicaciones para lo antes mencionado.

Como posible explicación al comportamiento del cuarzo se propo

ne que éste al estar en suero, puede quedar cubierto con algún componente sérico, por ejemplo albúmina, de tal manera que no permitiera el contacto del "sitio activo" de la partícula con el complemento. - Por otro lado, al haber probablemente menor concentración de cualquiera de los componentes séricos en el LBA (14), la partícula quedaría libre para producir dicha activación. Incluso podría hablarse de la presencia de inhibidores enzimáticos en el suero (57), que fueran los responsables de obstaculizar la acción del cuarzo a este nivel y que al no encontrarse en LBA dejaran libremente al cuarzo para interactuar y activar al complemento. También se podría postular la presencia de inhibidores macrofágicos del complemento como sería el inhibidor enzimático: inactivador de  $C_3E\beta_{1H}$  (58).

Se sabe que el zimosán es capaz de activar al complemento por la vía alterna, refiriéndose siempre a dicha activación como producto de la interacción del sistema del complemento con una macromolécula de polisacárido. Esto enfatiza la importancia de la superficie de contacto de la partícula por el cual se inicia la activación del complemento (67, 68). Esto nos lleva a otra posible explicación para la discrepancia de resultados encontrados en el caso del cuarzo, ya que la superficie de contacto en cada polvo es diferente. Aunque la concentración de los polvos inorgánicos empleados fue manejada por unidad de peso, la superficie específica de cada partícula es diferente. Se sabe que por ejemplo, el polvo de Mexicali tiene 4 veces más superficie de contacto que el cuarzo (64), por lo que esto pudiera ser una variable importante en la activación por vía alterna del

complemento.

Lo anterior conduce al hecho de que la interacción de ambos polvos es diferente y al haber mayor superficie de contacto en el polvo de Mexicali, su acción "in vitro" no fuera inhibida por componentes séricos, en tanto que la acción del cuarzo si lo fuera, quedando descubierto su actividad al disminuir el número de componentes inhibidores presentes en el suero y no en LBA.

Así mismo, el cuarzo en presencia de EDTA y EGTA produjo inhibición no significativa de la migración de macrófagos. Esto nos llevaría a pensar en la posibilidad de que ocurriera alguna de las siguientes posibilidades:

Primero, podría pensarse que la fracción presente en LBA que produce la migración de los macrófagos no es una fracción del complemento como  $C_{3a}$ , sino que se trata de alguna otra sustancia quimioatrayente no caracterizada.

Como segunda opción puede considerarse que si se identificó activación del complemento en el LBA por cuarzo, la respuesta quimiotáctica pudiera ser parcialmente debida a la fracción  $C_{3a}$  del complemento, existiendo alguna otra sustancia quimiotáctica, diferente de complemento, capaz de provocar una migración macrofónica complementaria - persistente a pesar de la inhibición (22, 68).

Como tercera opción, puede considerarse el hecho de que el cuarzo active al complemento por ambas vías (clásica y alterna) y que exista otra sustancia quimioatrayente. Esto explicaría los datos obtenidos de inhibición parcial de las dos vías de activación de comple-

manto (no significativa).

Todo lo anterior de cualquier manera conduce a inferir que la forma de reacción hacia la partícula inorgánica extraña en el organismo, está determinada en muy buena parte por las características físicoquímicas de las mismas, tales como: forma, tamaño y carga, así como, el medio de contacto del organismo con el cual interactúa primeramente.

Así, se sabe del asbesto que por su forma, induce cáncer pulmonar o mesotelioma (16, 55) y por su carga impartida por magnesio en su superficie, puede ser altamente hemolítico (8).

De cualquier manera sería interesante determinar, por ejemplo por electroforesis o cromatografía de permeación, el peso molecular de las fracciones de LBA activado responsables de la respuesta quimiotáctica con el objeto de identificar la fracción donde está el complemento y la posible existencia de algún factor o sustancia agregado.

En general, estableciendo una comparación entre los datos obtenidos en la identificación del complemento por el método de Mayer y la quimiotaxis. El zimósán, el crisótilo y polvo de Mexicali presentaron un comportamiento similar en suero y LBA, es decir, el comportamiento de los polvos inorgánicos antes mencionados fue de activación "in vitro" del complemento.

Por otra parte, según se comprobó por el método de Mayer se observó que la activación en LBA por dichos polvos inorgánicos, era capaz de producir una respuesta quimiotáctica proporcional a la acti.

vación del complemento, efectuada por vía alterna.

Sólo se encontraron discrepancias en cuanto a los datos obtenidos en activación del complemento en suero y LBA por el cuarzo los cuales ya fueron discutidos anteriormente.

Por último debemos señalar que uno de los aspectos originales de este trabajo es el haber utilizado ratas, ya que la existencia de complemento en las secreciones pulmonares de otras especies animales ya había sido reportada (14, 21, 51), a pesar de que la evidencia experimental del inicio de la lesión pulmonar inducida por inhalación de polvos inorgánicos ha sido obtenida básicamente en ratas.

En conclusión puede hablarse de que el complemento presente en la secreción pulmonar de rata es susceptible de ser activado "in vitro" por polvos inorgánicos. Esto nos conduce a inferir la participación del complemento como mecanismo iniciador de la respuesta inflamatoria, después de la inhalación de polvos inorgánicos, que pueden estar en forma libre como contaminantes en la atmósfera que nos rodea. Lo anterior confirma la hipótesis planteada.

## VI CONCLUSIONES.

1. Se identificó la presencia de complemento en lavado bronquinoalveolar de rata por el método de Mayer, quimiotaxis e inmuno difusión.
2. Se logró hacer una estimación de la cantidad de complemento de LBA concentrado que es aproximadamente 70 veces inferior a la presente en suero y al rededor de 1100 veces menor a la encontrada en LBA sin concentrar.
3. Se confirmó que el complemento presente en LBA es activado por la vía alterna por el zimosán y el crisólilo.
4. Se comprobó que el polvo de Mexicali es capaz de activar complemento sérico y en secreción pulmonar por la vía alterna.
5. El cuarzo presentó una respuesta quimiotáctica semejante a la activación del complemento en LBA por los otros polvos.
6. Se comprobó que el cuarzo y el polvo de Mexicali activan al sistema del complemento, el cual probablemente está involucrado en la respuesta temprana como mecanismo inicial de acción en presencia de partículas inorgánicas extrañas diferentes a asbesto "in vivo".
7. A futuro deben probarse modelos experimentales "in vivo" para comprobar si los mecanismos del sistema inmune, como el complemento, están involucrados en la respuesta primaria a depósito de partículas en las neumoconiosis.



## RESUMEN

Las enfermedades pulmonares inducidas por la inhalación de polvos inorgánicos, han sido motivo de estudios experimentales encaminados a reconocer los eventos iniciales en su patogenia. En el caso del asbesto, la respuesta inflamatoria observada en el pulmón de rata se inicia en el sitio de depósito de las partículas (la bifurcación de conductos alveolares). La migración del macrófago alveolar a estos sitios se atribuye a la activación del complemento de la secreción pulmonar por las partículas. A pesar de que otros polvos producen una reacción temprana tisular similar a la inducida por asbesto, no se ha descrito el mecanismo quimiotáctico inicial. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es identificar complemento en la secreción pulmonar de rata y secundariamente, tratar de activarlo con polvos como el cuarzo y polvo de Mexicali.

Las secreciones pulmonares se obtuvieron por lavado con solución salina amortiguada, se concentraron y liofilizaron. La identificación del complemento se hizo con la técnica de Mayer y por inmunodifusión con un suero anti-C<sub>3</sub> de rata. Se buscó inducir la activación del complemento en suero y lavado pulmonar mediante su activación "in vitro" con polvos inorgánicos, en el caso del lavado, se efectuó en presencia y ausencia de quelantes de Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup> (EDTA y EGTA). La existencia de factores quimiotácticos se estudió empleando cámaras de Boyden y macrófagos alveolares de rata. Estos estudios demostraron la presencia de complemento en LBA concentrado en cantidad aproximadamente 70 veces menor que en suero. Este complemento -

fue activado por todos los polvos empleados y se expresó en unidades de complemento hemolítico 50%, esta activación resultó en una respuesta quimiotáctica proporcional a la activación de complemento. Los estudios de quimiotaxis en ausencia de  $Mg^{++}$  sugieren que los polvos activan por vía alterna al complemento, los resultados comparativos con suero son similares, exceptuando la incapacidad del cuarzo para activar complemento en suero. Así, el complemento presente en secreción pulmonar puede ser activado por polvos inorgánicos, lo que sugiere su participación como mecanismo iniciador de la respuesta inflamatoria después de la inhalación de polvos inorgánicos.

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Bar-Ziv, A., Goldberg, G.M. "Simple siliceous pneumoconiosis in Na veg bedouins". Arch Environ Health . 29 121-126 (1974).
2. Bercklake, M.R. "Asbestos and lung cancer. The clinical questions" Chest. 78 2 372-373 (1980).
3. Bercklake, M.R. "Asbestos-related diseases of the lung and other organs: Their epidemiology and implications for clinical practice". Am Rev Resp Dis . 114 187-227 (1976).
4. Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Crystal, R.G. "Environmental lung disease and the interstitium". Chest Med . 2 3 293-417 (1981).
5. Brain, J.D., Knudson, D.E., Sorokin, S.P., Davis, M.A. "Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation". Env Res . 11 13-33 (1976).
6. Brain, J.D. "Macrophage damage in relation to the pathogenesis of lung diseases". Env Health Persp. 35 21-28 (1980).
7. Brody, A.R., Roe, M.W., Evans, J.N., Davis, G.S. "Deposition and translocation of inhaled silica in rats". Lab Invest 47 6 533-547 (1982).
8. Brody, A.R., Warheit, D.B., Chang, L.Y., Roe, M.W., Georges, G., Hill, L.H. "Initial deposition pattern of inhaled minerals and consequent pathogenic events at the alveolar level". Ann NY Acad Sci 428 108-120 (1985).
9. Callis, A.J., Soehnle, P.G., Mandel, G.S., Mandel, N.S. "Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis". J Lab Clin Med . 105 547-553 (1985).
10. Carbett, Mc.D.J. "asbestos and lung cancer has the case been proven?". Chest. 78 2 374-375 (1985). Supl.
11. Churg, A., Wright, J.L. "Small airways diseases induced by asbestos and non asbestos mineral dusts". Chest. 85 36-38 (1984).
12. Churg, A. "Lung cancer: cell type and asbestos exposure". Jama. 253 20 2984-2985 (1985).
13. Churg, A., Wright, J.L., Wiggs, B., Paré, P.D., Lazar, N. "Small airways disease and mineral dust exposure. Prevalence, structure and function". Am Rev Respir Dis. 131 139-143 (1985).

14. Fine, R., Shaw, J.O., Rogers, W.R. "Effects of  $C_3$  on baboon alveolar macrophages migration". Am Rev Respir Dis. 123 110-114 (1981).
15. Gerrity, T.H., Garrard, C.S., Yeates, J.B. "A mathematical model of particle retention in the air-space of human lungs". Brit J Indust Med. 40 121-130 (1985).
16. Harrington, J.S. "Fiber carcinogenesis: Epidemiologic observations and the Stanton hypothesis". Jnci. 67 977-989 (1981).
17. Henson, P.M., McCarthy, K., Larsen, G.L., Webster, R.D., Giclas, P.C., Dreison, R.B., King, J.E., Shaw, J.O. "Complement fragments, alveolar macrophages and alveolitis". Am J Pathol. 97 93-110 (1979).
18. Kagan, E., Oghisho, Y., Hartmann, D.P. "Enhanced release of a chemo-attractant for alveolar macrophages after asbestos inhalation". Am Rev Respir Dis. 128 680-687 (1983).
19. Kleinerman, J., Graen, F., Harley, R.A., et al. "Pathol standars for - coal workers pneumoconiosis". Arch Pathol Lab Med. 103 375-432 (1979).
20. Knight, G., Klack, B. "Comparison of respirable dust specifications with recent lung data". Am Ind Hyg Assoc J. 43 8 575-579 (1982).
21. Kolb, W.P., Kolb, L.M., Westel, K.A., Rogers, W.R., Shaw, J.O. "Quantification and stability the fifth component of complement  $C_5$  in bronchoalveolar lavage fluids obtained from non human primates". Am Rev Respir Dis. 123 226-231 (1981).
22. Kouzan, S., Brody, A., Nettesheim, P., Eling, T. "Production of arachidonic acid metabolites by macrophages exposed "in vitro" to asbestos, carbonyl iron particles or calcium ionophore". Am Rev - Respir Dis. 131 624-632 (1985).
23. Kovacs, E.J., Kelley, J. "Lymphokine regulation of macrophage derived growth factor secretion following pulmonary injury". Am J Pathol. 121 261-269 (1985).
24. Langer, A.M., Nolan, R.P. "Physicochemical properties of minerals - relevant to biological activities: Setate" of the Art En: In vitro effects of mineral dust. editado por Beck Eg y Signon J Na-to asi, springern Verlag 9-24 (1985).
25. Laocenas, J., Davis, G.S., Gale, P.M., Brody, A.R. "Mineral dust as etiologic agents in pulmonary fibrosis. The diagnostic role of analytical scanning electron microscopy". Am J Pathol. 78 701-706 (1982).

26. Lechner, J. F., Tokiwa, T., Laveck, M., Benedict, F., Banks-Schlegel, S., Yeagar, H., Banerjee, A., Harris, C. C. "Asbestos associated chromosomal changes in human mesothelial cells". Proc Natl Acad Sci. 82 3804-3888 (1985).
27. Lowry, D. H., Rosenberg, N. J., Farr, H. L., Randall, R. J. "Protein measurement with the folin phenol reagent". J Biol Chem. 193 265-275 (1951).
28. Lugano, E. M., Dauber, J. H., Danielle, R. P. "Silica stimulation of chemotactic factor release by guinea pig alveolar macrophages". J Reticul Soc. 30 381-390 (1981).
29. Lugano, E. M., Dauber, J. H., Danielle, R. P. "Acute experimental silicosis. Lung morphology, histology and macrophage chemotaxis secretion". Am J Pathol. 109 27-36 (1982).
30. Lunderborg, M., Beind, B., Cammer, P. "Ability of rabbit alveolar macrophages to dissolve metals". Exp Lung Research. 7 11-22 (1984).
31. Lyons, C. R., Lipscomb, M. F. "Alveolar macrophages in pulmonary immune response". J Imm. 130 3 1113-1119 (1983).
32. Mayer, M. "The complement system. En: Experimental immunochemistry 3th. printing. Kabat, E. A., Manfred, F. Charles C Thomas publisher - Springfield Illinois U.S.A. (1958).
33. Marrow, P. E., Rochester, N. J. "Experimental studies of inhaled materials a basis for respiratory models". Arch Intern Med 126 466-470 (1970).
34. Miller, K., Calvery, A., Kagan, E. "Evidence of quartz-induced chemotactic factor for guinea pig alveolar macrophages". Env Reseach. 22 31-39.
35. Mitchell, R. S., Judson, F. N., Moulding, T. S., Weiser, P., Brock, L. L., Kelble, R. L., Pollard, J. "Effects of urban air pollution. Special consideration of aerosol at 1500m and above". Jama. 242 1163-1168 (1979).
36. Morgan, R. H. "Proficiency examination of physicians for classification pneumoconiosis". Chest Films Avr. 132 803-808 (1979).
37. Morgan, W. K. C., Clague, H. W., Vinitzki, S. "On paradigms, paradoxes and particles". Lung. 161 195-206 (1983).
38. Morrow, P. E. "Lymphatic drainage of the lung in dust clearance". Ann NY Acc Sci. 200 46-65 (1972).

39. Osornio Vargas, A.R., Fortul, T.I., Cordero, M., Alvarez, M.A., Barrios, R. "Identificación de partículas contaminantes atmosféricas en pulmones de autopsias I cuernos ferruginosis". Patología. 21 - 109-123 (1983).
40. Osornio, A.R., Seoane, M., Yañez Buruel, A. "enfermedad intersticial-pulmonar asociada con la inhalación de polvos inorgánicos ambientales" La rev invest Clin. 38 59-63 (1986).
41. Osornio Vargas, A.R., Yañez, A., Alvarez, A., Castellanos, M. "Citotoxicidad y lesión pulmonar inducida por polvo ambiental: feldespatos". Patol. 22 2 217-225 (1984).
42. Osornio Vargas, A.R. "Lesiones pulmonares por polvos inorgánicos". Revisión. (1986).
43. Duchterlony, D., Nilsson, L.A. "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis". En: Handbook of experimental immunology. Weir, D.W. - 3th edition Ed Blackwell Sci publ. London 19.13 (1978).
44. Pinkerton, K.E., Brody, A.R., Mc Laurin, D.A., Adkins, B.J., O'Connor, R.W., Pratt, P.C., Crapa, J.D. "Characterization of three types of chrysotile asbestos after aerosolization". Environ Res. 31-32 (1983).
45. Pritchard, J.N., Holmes, A., Evans, J.C., Evans, N., Morgan, A. "The distribution of dust in rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation". Environ Res. 36 268-297 (1985).
46. Reiser, K.M., Hesterberg, T.W., Haschek, W.M., Last, J.A. "Experimental-silicosis I Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and macrophagic characteristics of rat lungs". Am J Pathol. 107 176-185 (1982).
47. Robertson, J., Caldwell, J.R., Castle, J.R., Waldman, R.H. "Evidence for the presence of components of alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions". J Imm. 117 3 900-903 (1975).
48. Rossiter, C.E. "Evidence of dose-response relation in pneumoconiosis". Trans Soc Occup Med. 22 83-87 (1972).
49. Saint-Remy, T.M., Cole, P. "Interactions of chrysotile asbestos fibers with the complement system". Imm. 41 431-443 (1980).
50. Schmidt, J.A., Oliver, C.N., Lepe-ZuMiga, J.L., Green, I., Gery, I. "Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin I". J Clin Invest. 73 1462-1472 (1984).

51. Shaw, J.O., Henson, P.M., Henson, J., Webster, R.D. "Lung inflammation-induced by complement derived chemotactic fragments in the alveolus". Lab Invest. 42 5 547-552 (1980).
52. Sherwin, R.P., Barman, M.L., Abraham, J.L. "Silicate pneumoconiosis of farm workers". Lab Invest. 40 5 576-582 (1979).
53. Sjöstrand, M., Rylander, R. "Enzymes in lung lavage fluid after inhalation exposure to silica dust". Environ Res. 33 307-311 (1984).
54. Snyderman, R. "Chemotaxis of human and murine mononuclear phagocytes". En: Adams, D.O., Edelson, P.J., Karen, H.S. Methods for studying mononuclear phagocytes. Academic Press NY (1981).
55. Stanton, M.F., Largard, M., Tergeris, A., Miller, E., May, M., Morgan, E., Smith, A. "Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous minerals". Inci. 67 965-975 (1981).
56. Stimler, N.P., Hugli, T.E., Bloor, C.M. "Pulmonary injury by C<sub>3</sub>a and C<sub>5</sub>a anaphylatoxins". Am J Pathol. 100 327-348 (1980).
57. Stuart, A.F., Habershaw, J.A., Davison, E.A. "Phagocytes in vitro". En: Handbook of experimental immunology. Weir, D.W. 3th edition Blackwell Sci Publ. London (1978) 33.1.
58. Swis-Cremer, G.K. "The relationship between asbestosis and bronchial cancer". Chest 78 2-8 (1980) Supl.
59. Tapp, E., Curry, A., Anfield, C. "Sand pneumoconiosis in an Egyptian mummy". Brith Med J 276 (1975).
60. Tucker, A.D., Wyatt, J.H., Undery, D. "Clearance of inhaled particles from alveoli by normal interstitial drainage pathways". J Appl Physiol. 35 5 719-732 (1973).
61. Warheit, D.B., Hill, L.H., George, G., Brody, A.R. "Time course of chemotactic factor generation and the corresponding macrophage response to asbestos inhalation". (1986).
62. Warheit, D.B., George, G., Hill, L.H., Snyderman, R., Brody, A.R. "Inhaled asbestos activates a complement chemoattractant for macrophages". Lab Invest. 57 (5) 505-514 (1985).
63. Wilson, K.P., Stevens, P.M., Lovejoy, H.B., Bell, Z.G., Richie, R.C. "Effects of chronic amorphous silica exposure on sequential pulmonary function". J Occ Med. 21(6) 399-402 (1979).



64. Yañez Buruel, A.G. "Desarrollo de sistemas "in vitro" que permitan valorar citotoxicidad de partículas contaminantes (polvo)" Tesis U.N.A.M. Facultad de Química (1985).
65. Zar, J.H. "Biostatistical Analysis. Prentice Hall INC. Englewood NJ (1974).
66. Ziskind, M., Jones, R.N., Weil, H. "Silicosis". State of the Art." - Am Rev Res Dis. 113 643-662 (1976).
67. Adams, D.O., Hamilton, T.A. "The cell biology of macrophage activation". Ann Rev Immunol. 2 283-318 (1984).
68. Nathan, C.F. "Secretory products of macrophage". J Clin Invest. 79 319-326.

APENDICE

Técnicas empleadas en el desarrollo del presente trabajo

- Obtención de suero anti-C<sub>3</sub> de rata.

Para la obtención de este suero se incubaron 15 ml de suero de rata normal con zimosén A (previamente hervido 30 minutos en agua destilada y lavado 6 veces con SSAF), en una concentración de 10 mg/ml a 37°C durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos. Se hicieron entonces un total de 6 lavados con SSI, recuperándose el complejo zimosén-C<sub>3</sub>.

Se efectuó el siguiente esquema de inmunización en conejo inyectando intramuscularmente el complejo zimosén-C<sub>3</sub>.

Día	Dosis	Vía de administración
1	25mg/ml	intramuscular
15	"	"(refuerzo)
22	"	"(refuerzo)
29	Obtención de suero.	

La obtención del suero se efectuó por punción cardíaca, teniendo así el suero anti-C<sub>3</sub> a título 1:8 (inmunodifusión radial).

## Evaluación de células pulmonares.

## - Conteo celular y tinción vital.

Una vez obtenidas las células, después del segundo lavado, se resuspendieron en 5 ml de medio amortiguador, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l de la suspensión celular y se puso en contacto con 100  $\mu$ l del colorante azul tripán al 0.05% en SSI, para observar paralelamente la viabilidad celular por exclusión del colorante.

Una fracción de esta suspensión se colocó en el hemocitóme - tro (cámara de Neubauer) y se contó el número de células que se encuentran en la cuadrícula empleada para el conteo de los glóbulos blancos, calculando:

$$\text{no. células/ml} = \frac{\text{No. células}}{4} \times 2 \times 10 \times 10^3$$

donde 4 : número de cuadros contados.

2 : dilución 1:2 empleada.

10 : distancia de la cámara.

$10^3$  : transformación de  $\text{mm}^3$  a ml.

La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante azul tripán, calculando:

$$\% \text{viabilidad} = \frac{\text{No. células teñidas}}{\text{No. células totales}} \times 100$$

### -Tinción citoquímica

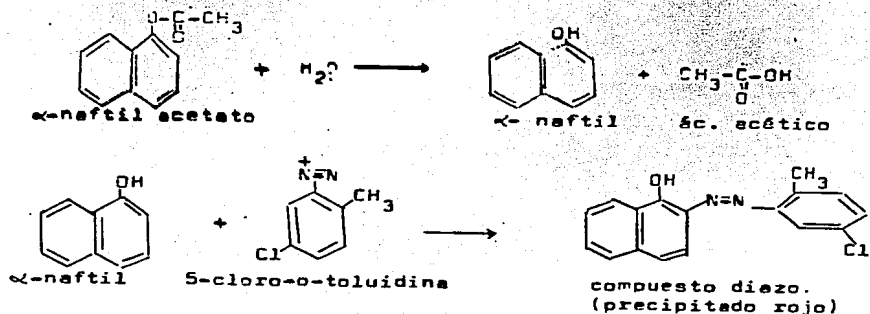
La esterasa no específica, es el rasgo citoquímico más característico de los monocitos y macrófagos, los cuales son capaces de catalizar reacciones del tipo:



Una alícuota de la suspensión celular se adhirió en cubreobjetos Thermanox en los que se probó la reacción citoquímica de esta enzima.

La preparación de células adheridas en los cubre-objetos se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente con un sustrato constituido por  $\alpha$ -naftil acetato al 6.25% (ver anexo) y 5-cloro-o-toluidina diazotado al 0.0625% (ver anexo), disueltos 1:1 en SSAF 0.1M a pH 7.3 y agua destilada.

la reacción que se efectúa con el sustrato empleado se muestra a continuación.



Las preparaciones se lavaron con agua destilada una vez transcurrido el tiempo de incubación y se pusieron en contacto con el colorante de contraste, verde de metilo durante 2 minutos. Se lavaron nuevamente con agua destilada y se observaron al microscopio de luz efectuando el conteo de células estearasa positivas (células con gránulos intracitoplasmáticos anaranjados (57) ).

- Cuenta diferencial.

De la suspensión celular obtenida y mantenida en medio amortiguador, se tomó una alícuota y se colocaron dos gotas de ésta en un portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente y una vez fijada con metanol, se tiñó la preparación con los colorantes de Eosina y Azure. Se montaron las preparaciones con resina y se efectuó una cuenta diferencial.

Estos cuatro métodos de evaluación de células pulmonares se efectuaron, cada vez que se realizó un experimento de quimintaxis y se requirieron células nuevas.

- Detección y semicuantificación de endotoxina en LBA, SSAF y agua destilada.

La prueba se practicó en tubos de ensayo para cada una de las tres muestras problemas antes mencionadas.

En una serie de tubos se agregaron 0.1 ml de agua bicestilada, SSAF o LBA según el caso y en otra serie de tubos, además de la mues

tra problema, se adicionó una dilución de endotoxina (estándar) a una concentración de 20 ng/ml.

Paralelamente se preparó un control negativo conteniendo 0.1ml de agua libre de endotoxina (ver anexo) y tres controles positivos, cada uno de los cuales con 0.1 ml de diluciones de endotoxina a concentraciones de 1 ng/ml, 0.5 ng/ml y 0.1 ng/ml.

A controles y problemas se agregó entonces 0.1 ml de lisado - E-toxato, se mezcló suavemente y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Pasado dicho tiempo, se procedió a realizar la interpretación de los resultados, tomando como datos positivos aquéllos en los que se presentó un gel duro.

## ANEXO

Lista de reactivos empleados para las determinaciones bioquímicas en el desarrollo del presente trabajo.

Reactivo	Marca
5-cloro-2-toluendiazonio	Sigma
$\alpha$ -naftil acetato	Sigma
Zimosan A	Sigma
Albúmina sérica bovina	Sigma
E-toxato (lisado)	Sigma
Limpiaeder E-toxato	Sigma
Agua libre de endotoxina	Sigma
Endotoxina de referencia 20ng/ml	Sigma
Medio RPMI 1640	Gibco
Bicarbonato de sodio para medio de cultivo	Gibco
HEPES	Sigma
Aquacide	Calbiochem Behring Corporation.