

01664

5

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CUERPOS FERRUGINOSOS Y CELULARIDAD EN EL
LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR EN PERROS DE LA
CIUDAD Y DE UNA ZONA RURAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
(PATOLOGÍA)**

**PRESENTA:
VANDA CANTÓN, BEATRIZ**

FALLA DE ORIGEN

1995



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.

DEDICATORIA:

**A todos los animales que padecen dolor
o enfermedad, por ser ellos el motivo que
me llevó a elegir esta hermosa profesión.**

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Nuri,
por la confianza que ha puesto en mí, por su amabilidad y buen humor a toda hora, por ser más que una Maestra, una amiga y un gran ejemplo que me compromete a seguir esforzándome.

A los Doctores Rogelio Jasso, Patricio Santillán, Raúl Olmos, José Luis Arreola, y Avelina Sorres, así como a Javier y al señor Amilcar, quienes integran el grupo de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
Gracias por brindarme su ayuda, sus instalaciones y su equipo, por hacer más fácil y agradable este trabajo y el trabajo de todos los días, y sobre todo, por ser más que mis compañeros, ¡mi familia!

Al Dr. Mario Vargas y al Biólogo Francisco Arenas,
por sus valiosas observaciones, y su gran disposición para asesorarme.

A los Doctores Rocío Chapela, Margarita Salazar, Patricia Alonso y Francisco Trigo, por el tiempo que dedicaron a leer este trabajo y por sus alentadores comentarios.

A Beatriz Cantón de Vanda,
que siempre se interesa por mí y por seguir de cerca lo que hago. Por su amor, sus cuidados y comprensión ¡gracias mamá!

A Natty y a Jorge, por su apoyo y su presencia siempre que los necesite.

A mis amigos y compañeros, con quienes compartí los cursos y sufrimientos durante la maestría.

A Alicia Montoya, por su asistencia técnica.

Finalmente, agradezco a cada uno de los perros, cuyas vidas tomé para llevar a cabo esta investigación. Con todo respeto y dolor de mi parte.

INDICE

01664
5
2ej

	Página
RESUMEN.....	i
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
INTRODUCCION.....	1
Contaminación atmosférica y partículas suspendidas.....	1
Cuerpos ferruginosos (CF).....	3
Clasificación de los CF.....	3
CF en tejido pulmonar y lavado bronquioloalveolar.....	5
OBJETIVOS.....	8
HIPOTESIS.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
Lavado bronquioloalveolar.....	11
Estudio citológico.....	12
Cuenta total y viabilidad celular.....	12
Cuenta diferencial.....	13
Obtención de los cuerpos ferruginosos.....	13
Estudio post-mortem.....	14
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS.....	16
Celularidad en el lavado bronquioloalveolar.....	16
CF en el lavado bronquioloalveolar.....	17
Estudio post-mortem de la cavidad torácica.....	18
Cuadros y figuras.....	20
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42

1995

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	<u>Página</u>
Cuadro nº 1. Pesos y edades promedio de los perros de cada grupo.....	21
Cuadro nº 2. Promedio de células inflamatorias totales en el lavado bronquioloalveolar (LBA) de perros de 4 zonas de la Cd. de México, y de una zona rural.....	22
Cuadro nº 3. Promedio de células inflamatorias/ml de LBA, en perros de 4 zonas de la Cd. de México y de una zona rural.....	23
Cuadro nº 4. Porcentaje de células inflamatorias en el LBA de perros.....	24
Cuadro nº 5. Cuerpos ferruginosos/20 ml de LBA.....	25
Cuadro nº 6. Porcentaje de cuerpos ferruginosos en LBA y en tejido pulmonar de perros.....	26
Cuadro nº 7. Niveles promedio de ozono y partículas respirables durante 1994, en 4 zonas de la Cd. de México.....	27
Cuadro nº 8. Principales industrias en la Cd. de México.....	28
Cuadro nº 9. Cuadro comparativo de la cuenta celular en el LBA en perros.....	29
Figura 1. Mapa de la zona metropolitana de la Cd. de México.....	30
Figura 2. Células totales en el LBA en perros de diferentes zonas.....	31
Figura 3. Cuenta diferencial celular en el LBA en perros.....	32
Figura 4. Cuenta de cuerpos ferruginosos en el LBA.....	33
Figura 5. Porcentaje de cuerpos ferruginosos en LBA.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

CF	Cuerpos ferruginosos
g	Gramo
g	Gravedades
i.v.	Endovenosa
LBA	Lavado bronquioloalveolar
ml	Millilitro
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro o micra
NE	Noreste
NO	Noroeste
O ₃	Ozono
PEMEX	Petróleos mexicanos
PM10	Partículas respirables menores a 10 micras
PST	Partículas suspendidas totales
ppm	Partes por millón
RAMA	Red Automática de Monitoreo Atmosférico
rpm	Revoluciones por minuto
SE	Sureste
SO	Suroeste
ZMCM	Zona metropolitana de la ciudad de México.

RESUMEN

CUERPOS FERRUGINOSOS Y CELULARIDAD EN EL LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR EN PERROS DE LA CIUDAD Y DE UNA ZONA RURAL.

MVZ Beatriz Vanda Cantón

Asesores: MVZ M.en C. Nuria de Buen de A.
Dr. Mario H. Vargas Becerra.
Biol. Francisco Arenas Huertero
Dr. Rogelio Jasso Victoria.

Las fibras de asbesto son contaminantes atmosféricos producidos por industrias cementeras, textiles y mineras entre otras; y que al ser inhaladas, dan origen a la formación de cuerpos ferruginosos (CF) en el pulmón. El objetivo de este trabajo fue detectar, por medio de lavado bronquioloalveolar (LBA), la cantidad de CF en el aparato respiratorio de perros provenientes de 4 diferentes zonas de la Ciudad de México y de la zona rural de Lerma, en el Edo. de México. Además se estudió la población de células inflamatorias del pulmón y su posible relación con estos contaminantes. Previa anestesia con pentobarbital sódico, se realizó LBA del lóbulo diafragmático derecho a través de un fibrobroncoscopio flexible, introduciéndoles un volumen total de 60 ml de solución salina al 0.9%, el líquido recuperado fue centrifugado y separado en 3 alícuotas: con 2 de ellas se llevó a cabo el estudio citológico de viabilidad, cuenta total y diferencial, y a la 3ª de ellas, se le agregaron 5 ml de hipoclorito de sodio al 13% para "digerir" la materia orgánica, posteriormente se filtró a través de membranas de nitrocelulosa para recuperar los CF, los cuales se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio con contraste de fases. Los resultados se expresan como CF/20ml de LBA, y se muestran como el promedio de cada grupo. Los perros de la zona noreste presentaron una cantidad significativamente mayor de CF/20 ml (10 ± 8.6) que los de la zona suroeste (2 ± 1.94 ; $p < 0.05$) y que en la zona rural de Lerma (1 ± 0.76 ; $p < 0.05$). En lo que respecta a la celularidad, no hubo diferencias en la cuenta total celular, ni en el número de macrófagos entre ninguno de los 5 grupos de estudio; sin embargo, al comparar la cuenta de linfocitos, los animales de la zona suroeste tuvieron una cantidad significativamente mayor que los de la zona noreste ($143,093$ $EE=32,204$ vs $81,741$ $EE=12,340$; $p < 0.05$) y sureste ($79,996$ $EE=10,787$; $p < 0.05$). La zona suroeste también presentó un número estadísticamente más elevado de neutrófilos que la zona noreste ($32,878$ $EE=8,161$ vs $7,729$ $EE=3,335$; $p < 0.02$) y que la zona rural ($8,855$ $EE=4,663$; $p < 0.04$). De lo anterior se concluye que el perro es un excelente modelo de exposición natural a los contaminantes atmosféricos, ya que los cánidos de la zona noreste y noroeste de la Cd. de México, que son las zonas industriales, fueron los que mostraron la mayor cantidad de CF, en tanto que en los de la zona rural, fue donde se observaron en menor número. La zona suroeste, presentó la cuenta más elevada de neutrófilos y linfocitos, sin embargo, este incremento no guardó relación con el número de CF detectados en el LBA.

INTRODUCCION

Contaminación atmosférica y partículas suspendidas.

Las grandes ciudades como sitios de concentraciones humanas, son hoy en día, los lugares más afectados por la contaminación ambiental, ya que en ellas se conjuntan gran cantidad de fuentes naturales y no naturales que generan contaminación, como son: los motores de combustión interna, la basura, las aguas no tratadas, baños públicos, incineradores, refinerías, fábricas de todo tipo, industrias petroquímicas y de la construcción,⁴⁶ etc.

La Ciudad de México es un buen ejemplo para estudiar los efectos nocivos que la urbanización y la industrialización han tenido sobre el medio ambiente, no sólo por la gran cantidad de contaminantes atmosféricos que genera una población de más de 20 millones de habitantes, por la que circulan más de 2.5 millones de vehículos automotores y donde se concentra el 25% de todas las industrias del país, sino además, por su particular situación geográfica, como es el hecho de estar localizada en una cuenca rodeada de montañas, lo que propicia una circulación de los vientos provenientes del noroeste-noreste hacia el suroeste.⁸ Los contaminantes atmosféricos se pueden encontrar en forma de gases y como material particulado ya sea orgánico o inorgánico. En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) se miden diariamente los niveles de dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), ozono (O₃), ácido sulfhídrico (H₂S), así como plomo y partículas suspendidas totales (PST), esto se hace a través de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA), que cuenta con 25 estaciones distribuidas en diferentes puntos de la ZMCM.⁶²

Las partículas suspendidas totales (PST) constituyen un amplio espectro de sólidos (carbón, silicatos, metales, cemento y toda clase de polvos) que miden entre 0.2 y 500 µm, éstas pueden provenir de la erosión de suelos, y áreas de cultivo sin barreras rompevientos, sin embargo en áreas urbanas, la fuente primaria es la quema de combustibles derivados de hidrocarburos, fundidoras, polvos industriales y de la construcción.^{17,27} La fracción respirable de PST está constituida por aquellas que miden menos de 10 µm. Según informes de PEMEX, de 1991 a la fecha, las zonas más contaminadas por PST se encuentran en el

noreste de la ciudad de México.⁵⁸ Dichas PST son responsables también de la reducción de la visibilidad y el aspecto "nuboso" de la ciudad de México.

Dependiendo de su tamaño, las PST pueden permanecer en el aire durante segundos o incluso varios meses hasta que son acarreadas por el viento o la lluvia. En la superficie de dichas partículas, se condensan vapores y microgotas de SO₂ y NO₂ que se convierten en ácidos y que, al ser transportados junto con éstas, aumentan su efecto agresor al entrar en contacto con los tejidos corporales; las partículas también pueden adsorber metales pesados como plomo, níquel y cobalto, y carcinógenos como el benceno y otros hidrocarburos aromáticos, facilitándoles de esta manera su penetración al aparato respiratorio y prolongando su permanencia en él.^{55,73} Se sabe que algunos de los efectos de los metales pesados sobre el organismo son: reducción de la actividad de las células NK, disminución de la función fagocítica de los macrófagos y de la producción del interferón gamma, así como abatimiento de la respuesta inmune humoral.^{31,68}

En animales de experimentación se ha visto que la exposición a PST disminuye mecanismos de defensa tales como la limpieza mucociliar y la fagocitosis,⁴⁷ favoreciendo de esta manera, las infecciones del tracto respiratorio.

Las partículas que miden más de 10 µm son retenidas en el epitelio de la nariz, cavidad oral y faringe, desde donde pueden ser expectoradas, y aquellas menores a 10 µm (PM10)^{17,54} penetran fácilmente hasta los espacios alveolares, en donde se depositan y pueden permanecer por años, provocando entre otras cosas, irritación mecánica sobre los tejidos.³²

El depósito de las partículas puede ocurrir mediante sedimentación en el caso de partículas grandes, impactación por inercia en las vías respiratorias craneales o superiores, y difusión a nivel alveolar.³⁰

El patrón de distribución del material particulado depende además de su tamaño, de la velocidad y profundidad de la respiración, se ha visto que una respiración profunda y lenta favorece una mayor dispersión de éstas, haciéndolas llegar más periféricamente.⁵⁴ Es importante señalar que el depósito y permanencia de partículas puede verse incrementada por exposición a gases irritantes como el ozono⁵⁹ así como por el hábito de fumar^{50,52} ya que ambos factores disminuyen los mecanismos de depuración mucociliar y alveolar en el pulmón.³⁰

Cuerpos ferruginosos (CF).

Las PM10 comprenden a los "cuerpos ferruginosos", este término fue introducido por Gross para referirse a una amplia gama de partículas y fibras que incluyen al asbesto, las cuales después de ser inhaladas, se retienen en el pulmón³² en donde no pueden ser digeridas ni disueltas; aquellas que miden menos de 5 μm , son rodeadas y fagocitadas por macrófagos, y si son más grandes, los macrófagos tienden a fusionarse para lograr incorporar la fibra en sus vacuolas citoplásmicas⁷¹ donde primero es cubierta por mucopolisacáridos ácidos; posteriormente, se van incorporando miscelas de hierro en las vacuolas fagocíticas, este hierro proviene de la hemosiderina que se encuentra en el citoplasma de los mismos macrófagos y es producto de la degradación de la hemoglobina; las miscelas tienden a concentrarse alrededor de las fibras hasta cubrir las con una proteína semejante a la ferritina,⁷² permitiendo aislarlas del citoplasma y así eliminarlas o neutralizarlas de alguna forma,⁵² aunque al mismo tiempo, esto las hace menos móviles y menos susceptibles de ser depuradas por vía linfática.⁶ La mayoría de las partículas que no son recubiertas, permanecen tal cual, sobre todo si quedan localizadas intracelularmente, y el daño que provocan dependerá de su tamaño y forma, más que de su composición.⁷⁰

Clasificación de los cuerpos ferruginosos.

De acuerdo a su naturaleza y morfología, los cuerpos ferruginosos han sido divididos en "típicos" y "atípicos", los primeros se refieren a los verdaderos cuerpos de asbesto, que incluyen diversos silicatos caracterizados por poseer una estructura fibrosa cristalina,^{14,29} además de propiedades físicas como gran fuerza tensil, alta resistencia al calor y a la agresión química, por lo que su aplicación y su uso han alcanzado gran difusión, especialmente en la elaboración de productos aislantes y material para construcción.³⁶ Al microscopio de luz, son ópticamente transparentes, y se observan como estructuras que miden entre 10 a 20 μm de largo por 2 a 5 μm de espesor, con extremos más gruesos en forma de

ciava y una cubierta que presenta secciones transversas simétricas color café-amarillento o dorado, misma que les confiere su peculiar aspecto de "cuentas de rosario";²¹ si bien algunos de ellos, pueden adoptar una forma semicircular semejante a una herradura.¹³

Las fibras de asbesto se dividen a su vez, en 2 grandes grupos: los serpentinos (crisotilo) y los anfíboles (amosita, crocidolita, antofilita, tremolita y actinolita).¹⁴

Dentro de los cuerpos de asbesto, el crisotilo constituye más del 90% de los asbestos utilizados comercialmente,¹⁴ también se encuentra con frecuencia en las rocas y el aire urbano, sus fibras miden de 1 a 5 µm de longitud por 0.2 µm de diámetro, y a pesar de que se le considera como el tipo de asbesto más inhalado, no es el que se observa en mayor cantidad en los pulmones,⁴⁴ esto se explica porque además de ser una fibra muy pequeña, está compuesta principalmente por magnesio, que es altamente soluble, de modo que el crisotilo puede disolverse y ser fácilmente removido del pulmón^{44,45} llegando hasta la pleura parietal (atravesando la cavidad pleural), o bien, puede ser transportado por vía linfática hacia los nódulos linfáticos hiliares, y ahí, pasar al torrente sanguíneo para depositarse en sitios extrapulmonares como es el peritoneo.^{37,44} Por esta razón, la pleura es el sitio más frecuente en donde suelen observarse los CF con centro de crisotilo, y por ello, este es el tipo de asbesto que juega un papel importante en la inducción de mesoteliomas, placas hialinas y fibrosis pleural.⁴⁴

Entre los anfíboles, la amosita y la crocidolita son los que poseen importancia comercial por su uso en la industria de la construcción, y cuando se habla de CF "típicos" son estos los que se encuentran en mayor número y frecuencia en los pulmones de seres humanos,¹² y los que se han considerado más importantes en el desarrollo de asbestosis, mesoteliomas^{15,18,77} y cáncer pulmonar.⁴⁴ Sin embargo, Churg menciona haber hallado un alto porcentaje de tremolita y antofilita en pulmones de mujeres,¹² y lo atribuye a que son componentes del talco y los cosméticos.²⁶

Los CF "atípicos" también llamados pseudocuerpos de asbesto, se caracterizan por no contener asbesto en su interior, sino que su centro está constituido ya sea por carbón (centro negro), láminas de silicato (centro amarillo brillante), diatomeas terrestres,^{14,57} u otro tipo de partícula que adquiera una cubierta férrica dentro del organismo.

Los CF atípicos observados con mayor frecuencia en personas y animales, son los que poseen carbón, sus formas y dimensiones guardan bastante semejanza con los CF típicos, pudiendo ser confundidos, al microscopio de luz se distinguen por su centro negro birrefringente. Se han observado en mineros y trabajadores de la industria del carbón, se asocian a neumoconiosis; pueden estar constituidos por hulla, grafito o dióxido de titanio.¹⁴

Otra clase de CF atípicos son aquellos que en su interior contienen delgadas láminas de silicatos, y debido a la diversidad e irregularidad de formas que pueden tener (poligonal, rectangular, y casi siempre plana), su cubierta férrica también suele ser irregular, su centro es amarillo pálido refráctil; su origen suelen ser micas, talcos, arcilla, o vidrio.¹⁴

El tercer grupo de CF atípicos, son los que albergan en su centro a diatomeas terrestres; estos CF se distinguen porque son anchos (200 μm aprox.), segmentados, cilíndricos, y tienden a adoptar un aspecto de acordeón o bien, pueden semejar un "gusano". Su color va de dorado a café-anaranjado.¹⁴ Se observan con mayor frecuencia en el aparato respiratorio de los animales, más que de los humanos.

Para lograr una exacta identificación del tipo de partícula mineral que dió origen al CF, y poder clasificarla adecuadamente, se requiere de técnicas sofisticadas y complejas como son la microscopía electrónica, la cristalografía, la difracción y/o el microanálisis por dispersión de rayos-X.^{15,25} Con el microscopio de luz sólo es posible clasificarlos en típicos o atípicos.

CF en tejido pulmonar y en Lavado bronquioloalveolar (LBA).

Estudios efectuados en México y en otras ciudades del mundo, mencionan un aumento en la incidencia de padecimientos intersticiales pulmonares,⁵⁶ así como un sustancial incremento en las fibras de asbesto encontradas tanto en el ambiente, como en la mayoría de los pulmones de los habitantes de ciudades industrializadas.^{6,13} Por muchos años, los cuerpos ferruginosos fueron observados sólo en personas con alta exposición a los polvos de asbesto, como aquellas que trabajan en la industria metalúrgica, minera, del vidrio, termoeléctrica y textil, o en la industria de la construcción como albañiles,

plomeros, carpinteros, etc., considerándose este hallazgo como un indicador de riesgo ocupacional, sin embargo, en las dos últimas décadas, varios autores han encontrado CF en autopsias de pacientes sin evidencia de exposición ocupacional.^{2,6} En 1979, Churg reportó haber encontrado CF en el 96% de los habitantes de áreas urbanas en los Estados Unidos,¹² en cantidades de 9,000 a 100,000 CF/g de tejido pulmonar en pacientes con asbestosis, y menos de 100 CF/g en personas sin exposición ocupacional; el 98% de estas fibras correspondían a anfíboles.

Por otro lado, en Bélgica, De Vuyst encontró en el lavado bronquioloalveolar de trabajadores con alto riesgo de exposición, 120 CF/ml, y 1 CF/ml en sujetos sin exposición.²³

En México, en 1988, Arenas y col., encontraron un promedio de 17 CF/g de tejido pulmonar seco, en humanos residentes del Distrito Federal sin exposición laboral, y hasta 1,000 CF/g en aquellos con exposición; el 85% de los CF observados fueron identificados como típicos.³

Desde 1984, De Buen y col. reportaron la presencia de CF en pulmones de perros de la ciudad de México,²¹ y para 1994, Gualito encontró un promedio de 784 CF/g de tejido seco, en perros de esta misma ciudad,³³ y cuya exposición se considera meramente ambiental.

Otras investigaciones mencionan haber encontrado 1,000 CF/g de tejido pulmonar y hasta 5 CF/ml de LBA en pacientes con asbestosis, además de un elevado porcentaje de neutrófilos, considerando estas cifras como exposición ocupacional. En personas que trabajan con granito, el LBA mostró partículas de sílice en el interior de los macrófagos y un aumento en el número de linfocitos.¹⁹

Los efectos neoplásicos y fibrogénicos de la inhalación crónica de asbesto y de otros silicatos minerales fibrosos, son bien conocidos, e incluyen asbestosis (cuerpos de asbesto concomitantes con fibrosis intersticial difusa del pulmón), silicosis, fibrosis pleural, efusiones pleurales, cáncer broncogénico,⁴³ y mesotelioma principalmente.^{6,18,44,57} Sin embargo, la patogénesis de estas enfermedades no ha podido ser aclarada del todo. Estudios de varios investigadores no lograron encontrar correlación entre el número de CF y la

presencia o ausencia de cáncer pulmonar o gástrico,¹⁶ aunque otros autores mencionan que para llegar a observar este tipo de daños, se requieren de varios factores: dosis acumulativas de CF en el aparato respiratorio, exposiciones continuas por más de 20 años, "susceptibilidad" individual y cierto tipo y cantidad de fibras.^{6,44,52} Además también se sabe, que en ocasiones, los CF pueden llegar a ser finalmente eliminados del pulmón, años después de haber provocado las lesiones.³⁸

OBJETIVOS:

1. Aplicar la técnica de lavado bronquioloalveolar (LBA), para obtener cuerpos ferruginosos (CF), y estudiar la celularidad del aparato respiratorio en perros de 4 diferentes zonas de la ciudad de México y de una zona rural, utilizándolos como un modelo natural de exposición ambiental a las partículas inorgánicas contaminantes de la atmósfera.
2. Evaluar las posibles alteraciones morfológicas en las células epiteliales, así como en la cuenta total y diferencial de células inflamatorias del pulmón en cada una de las 5 zonas de estudio.
3. Establecer los parámetros normales de la cuenta celular en el LBA, para los perros de la Cd. de México.
4. Detectar la cantidad de CF presentes en el LBA en perros de las 5 diferentes zonas de estudio, comparándolos entre sí; estimando además, el grado de correlación que guardan con los resultados obtenidos previamente en el tejido pulmonar de los mismos cánidos.
5. Identificar cambios cito e histológicos en el aparato respiratorio de los perros, y su posible relación con la presencia de CF.
6. Determinar si existe relación entre los hallazgos en el aparato respiratorio de los cánidos provenientes de las distintas zonas del D.F., y los registros de la calidad del aire, de la zona metropolitana de la Cd. de México.
7. Investigar si las diferencias en la cuenta celular y en el número de CF dependen de la edad o del peso de los animales.

HIPOTESIS

- Mediante la técnica del LBA, es posible obtener información acerca del grado de exposición ambiental a la fracción respirable de las partículas suspendidas totales, representadas por los cuerpos ferruginosos.

- Los perros de las zonas industriales de la ciudad de México, mostrarán mayor número de CF que aquellos provenientes de una zona rural. Y a su vez, guardarán correlación con las cifras de partículas suspendidas reportadas por la RAMA.

- Los perros que presenten mayor cantidad de CF en el LBA, mostrarán también alteraciones en la cuenta de células inflamatorias del pulmón, y esto podrá verse reflejado en el tejido pulmonar.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron un total de 42 perros mestizos, 21 hembras y 21 machos, de diferentes pesos (de 5 a 30 Kg) y con una edad promedio de 5.5 ± 0.8 años (Cuadro 1). Todos los animales fueron sometidos a un minucioso examen clínico previo al estudio, para constatar que no estuvieran padeciendo ningún tipo de afección respiratoria, ni la hubieran padecido recientemente; los que no mostraron estar sanos o presentaron descarga nasal u ocular, no se incluyeron en el protocolo.

Los animales se dividieron en 5 grupos, dependiendo de su lugar de procedencia, procurando que pertenecieran a cada una de las 4 diferentes zonas en las que la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA), de la Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México (CMPCCAVM), ha dividido a la Ciudad de México, aclarando que no se tomó en cuenta a la zona centro, por la dificultad de obtener perros de dicha zona (Fig.1).

Grupo 1: Zona noroeste (n=10)

Grupo 2: Zona noreste (n=7)

Grupo 3: Zona sureste (n=10)

Grupo 4: Zona suroeste (n=9)

El 5º grupo de estudio, estuvo integrado por 6 perros provenientes de una zona rural, ubicada en el Municipio de Lerma, Edo. de México.

Con el fin de poder traspolar nuestros resultados a lo que podría estar ocurriendo en los humanos de los diferentes puntos del Valle de México, se mencionan a continuación, las regiones que comprende cada zona:

Noroeste (NO): Azcapotzalco, Tacuba, Tlalnepantla, Atizapán, Naucalpan.

Noreste (NE): Aragón, La Villa, Zacatenco, Xalostoc, Nezahualcóyotl.

Sureste (SE): Tláhuac, Iztapalapa, Cerro de la Estrella, Xochimilco.

Suroeste (SO): Tlalpan, Contreras, Coyoacán, Pedregal, Portales.

Zona rural (ZR): Lerma, Edo. de México.

Todos los perros, a su llegada al bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, fueron desparasitados externamente con un baño

de Coumaphos, y vacunados contra la rabia por vía intramuscular; al día siguiente, recibieron desparasitación interna con Nitroscanato (50mg/kg). Fueron mantenidos en observación en perreras individuales, durante una semana, antes de iniciar los estudios. Recibieron alimento comercial comprimido y agua a libre acceso.

Lavado bronquioloalveolar (LBA).

Los perros fueron anestesiados con pentobarbital sódico (28 mg/kg) endovenoso, y se les introdujo por vía oral, una cánula endotraqueal, a través de la cual se hizo pasar un fibrobroncoscopio flexible Olympus BF tipo 1T20D, de 6 mm de diámetro, que fue dirigido a la laringe y de ahí, guiado cuidadosamente hacia el lóbulo diafragmático derecho, ya que por su disposición anatómica, los bronquios apicales presentan cierta dificultad para ser abordados,^{19,28,40} además de que por gravedad, la mayoría de las fibras y partículas tienden a acumularse en las regiones basales y periféricas.⁷⁴ El broncoscopio fue conducido a través de varias generaciones bronquiales, con el fin de llegar lo más profundo posible y poder enclavarlo en un bronquio de pequeño calibre, asegurando de esta manera que el lavado fuera realmente bronquioloalveolar.

Se administraron por el broncoscopio 15 ml de solución salina al 0.9%, estéril, a 38°C, el líquido fue mantenido en el interior del lóbulo pulmonar durante 20 a 40 segundos, para luego, ser aspirado suavemente con una bomba de vacío de succión constante, con una presión negativa de 100 mmHg, y colectándose en una trampa; este procedimiento fue repetido 4 veces hasta completar un volumen total introducido de 60 ml^{49,60}. La primera alícuota recuperada, fue desechada, porque su contenido es considerado de procedencia "bronquial" más que "alveolar",^{19,48} y por lo mismo, no es lo suficientemente representativa. El líquido obtenido del resto de las alícuotas, fue mezclado en la trampa y se cuantificó el volumen total recuperado, que en todos los casos, fue superior al 77% del volumen introducido. Dicho líquido fue colocado en diferentes tubos de ensayo para su análisis, el cual constó de:

- 1) Estudio citológico.
- 2) Búsqueda de cuerpos ferruginosos.

Estudio citológico.

El estudio citológico comprendió a su vez:

- a) cuenta total y viabilidad celular.
- b) cuenta diferencial de células inflamatorias.

Cuenta total y viabilidad celular.

Para la cuenta de células totales en fresco, uno de los tubos se centrifugó inmediatamente, a $600 \times g$ (1500 rpm) durante 10 minutos en una centrifuga Beckman CS-6R refrigerada a 4°C ; el sobrenadante fue decantado y el botón celular se resuspendió en 2 ml de una solución buffer de fosfatos ($\text{pH}=7.4$),¹⁰ se tomaron 50 μl de la resuspensión y se colocaron en otro tubo de ensaye, al cual se le añadieron 50 μl de Azul de Trípano, que tiñe exclusivamente a las células muertas; de esta dilución se tomaron 10 μl y se depositaron en un hemocitómetro o cámara de Neubauer para realizar la cuenta total de leucocitos y evaluar al mismo tiempo, su porcentaje de viabilidad. Las muestras con menos del 80% de células vivas fueron excluidas del estudio. También se eliminaron las muestras en donde se observaron eritrocitos, por considerarse que el LBA fue traumático y se contaminó con sangre, de modo que las células podrían provenir de la hemorragia, y no sólo de las vías aéreas.

La cuenta celular se reportó como número de células/ml de LBA, y esto se obtuvo aplicando la fórmula siguiente:⁷

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{Dilución} \times 10 \times 10^3}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrantes}}$$

En donde:

El factor de dilución = 2

El 10 = volumen del hemocitómetro (profundidad 0.1 mm)

El 1,000= conversión de microlitros a mililitros

El N° de cuadrantes = 4

Cuenta diferencial.

Para realizar la cuenta diferencial, a otro de los tubos que contenían líquido recuperado del LBA, se le añadió un volumen igual de carbowax como fijador, ya que éste conserva adecuadamente las características morfológicas de las células, y facilita su identificación.⁶⁵ La muestra se centrifugó de la misma forma descrita anteriormente, se desechó el sobrenadante y con el botón celular se hicieron varios frotis para las tinciones de Hematoxilina y eosina, Papanicolaou y Diff-quick. Posteriormente, se observaron al microscopio de luz (40X), y se contaron un total de 200 células de cada frotis,⁶⁰ identificando macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, y se reportaron tanto en forma porcentual como en células/ml. Además se revisaron las células epiteliales bronquiales para detectar cualquier alteración que pudieran presentar.

Obtención de los cuerpos ferruginos (CF).

El resto del líquido recuperado del mismo LBA, que en la mayoría de los casos consistió en 20 ml, fue centrifugado de igual manera que el anterior, se desechó el sobrenadante y, al sedimento se le añadieron 5 ml de hipoclorito de sodio al 13%, se agitó vigorosamente en un vórtex y se dejó por 2 horas a temperatura ambiente (para que se llevara a cabo la "digestión" de las células y material orgánico). Después se centrifugó a $1,200 \times g$ (2,500 rpm) por 10 minutos; el sobrenadante se decantó, y al sedimento se le agregaron 2 ml de cloroformo (con el fin de separar lípidos) y 2 ml de alcohol etílico al 50% (para precipitar proteínas).⁶⁹ Se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante, y se recuperó la interfase.¹¹ Se agregó alcohol etílico al 95%, y se dejaron reposar las muestras por 24 horas, al cabo de las cuales, se filtraron en un aparato de vacío de 12 celdas (Millipore Co.), a través de membranas de nitrocelulosa tipo HA (Millipore) de 25 mm de diámetro, y un tamaño del poro de $0.45 \mu m$.^{11,23,24,69} Estos filtros fueron pasados por cloroformo y aclarados con xilol, luego se montaron en portaobjetos con resina

sintética, y se cubrieron para ser observados en el microscopio de luz (100x), con contraste de fases.^{23,24} Se recorrieron todos los campos del filtro, y los CF encontrados, se contabilizaron y se clasificaron como "típicos" o "atípicos".

Estudio post-mortem.

Después de llevado a cabo el LBA, y con el fin de obtener una muestra de parénquima pulmonar, los perros se sometieron a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico i.v.; se les realizó toracotomía post-mortem para inspeccionar la cavidad torácica y obtener un fragmento del lóbulo diafragmático del pulmón derecho (el mismo en el que se realizó el lavado). Las muestras de tejido se colocaron en frascos con formalina amortiguada al 10% para su fijación. Fueron incluidas en parafina, se realizaron cortes de 4 µm de grosor, se montaron en portabjetos³⁴ y fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina, con Perl's y con tricrómica de Masson, para ser observadas en el microscopio de luz (40x), e identificar posibles lesiones y/o cambios inducidos por la presencia de CF.

El número de CF obtenidos en el LBA, se comparó contra los observados en el tejido pulmonar de los mismos perros, reportados en un trabajo previo,³³ y se estableció la relación entre ambos resultados.

Análisis estadístico.

En lo referente a la celularidad, los resultados obtenidos se expresaron como células/ml de LBA recuperado, y se presentan como el promedio de cada grupo; en cuanto a los CF, también se presentan como el promedio de cada zona, expresados como CF/20 ml de LBA.

Con el fin de probar que, al menos uno de los 5 grupos era diferente al resto de los otros, se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA), tanto para las cuentas celulares como para el número de CF; y posteriormente, para investigar entre cuáles parejas de grupos existía diferencia estadística, se aplicó la "t" de Dunnet o la U de Mann-Whitney no pareada,²⁰ según el caso.

Para saber si la edad y el peso de los perros guardaban relación con la cuenta celular y con el número de CF recuperados en los LBA, se llevaron a cabo Regresión lineal y prueba de correlación de Pearson.^{20,51} Estos mismos análisis también se aplicaron para averiguar si las diferencias en la celularidad se relacionaban con la cantidad de CF o con las concentraciones atmosféricas de algún otro contaminante, como el ozono.

También se aplicó regresión lineal y "t" de Pearson, para establecer la relación entre el número de CF encontrados en el LBA y en el parénquima pulmonar de estos mismos perros.

Para averiguar si los cambios histológicos de la pleura estaban relacionados con el número de CF encontrados, se aplicó una prueba de correlación de Spearman.⁵¹

En todas las pruebas realizadas, una $p < 0.05$ bimarginal, fue considerada como significativa.

R E S U L T A D O S

Celularidad en el LBA.

El porcentaje de viabilidad de las células obtenidas por medio de LBA, fue en promedio, del 87% para el grupo de la zona noroeste (NO), 84% para la zona noreste (NE), 90% para la sureste (SE), 84% para la suroeste (SO) y del 92% para la zona rural de Lerma (ZR).

A pesar de que aparentemente el grupo del SO mostró un mayor número de células totales, esta diferencia no resultó ser significativa (Fig. 2 y Cuadro 2), tampoco hubo diferencia estadística en el número de macrófagos, entre ninguno de los 5 grupos.

En lo que respecta a los linfocitos, sólo se encontraron diferencias cuando se realizaron comparaciones entre las 4 zonas del Valle de México, resultando la zona SO con una cuenta linfocitaria significativamente mayor que la zona NO ($143,093 \pm 96,612$ vs $81,741 \pm 39,022$; $p < 0.05$) y que la zona SE ($79,996 \pm 34,112$; $p < 0.05$), pero ninguno de los grupos del D.F. mostró tener un número estadísticamente diferente de linfocitos al de la zona rural de Lerma.

Sin embargo, al comparar las cuentas de neutrófilos de los 5 grupos, la zona SO presentó una cantidad significativamente más elevada que la zona NE ($32,878 \pm 24,483$ vs $7,729 \pm 8,824$; $p < 0.02$) y que la zona rural ($8,855 \pm 11,421$; $p < 0.04$). Por su parte, la zona NO, tuvo un número estadísticamente mayor de neutrófilos que la zona NE ($19,017 \pm 11,013$ vs $7,729 \pm 8,824$; $p < 0.04$) (Fig. 3; cuadros 3 y 4).

No se menciona el análisis de la cuenta de eosinófilos, por tratarse de un tipo celular que no suele encontrarse comúnmente en los LBA de los mamíferos sanos; más del 50% de estos perros no presentaron eosinófilos en sus frotis.

Al comparar el promedio de la celularidad de los LBA de todos los perros de la ciudad de México, contra los de la zona rural, no se observó diferencia estadística para ningún tipo celular, salvo al comparar la cuenta de neutrófilos, sin embargo, esta diferencia sólo fue unimarginal ($19,736.11 \pm 17,026.56$ vs. $8,855 \pm 11,420.76$, $p < 0.027$).

Las células epiteliales, no mostraron alteraciones ni cambios en su morfología, en ninguno de los LBA.

No se encontró relación entre la edad y peso de los animales y su cuenta celular total y diferencial.

Cuerpos ferruginosos en el LBA

En la zona NO, el 90% de los perros presentó CF en el LBA; en la zona NE el 100% de los perros presentó CF, en la SE el 87%, en la SO el 75%, y en la zona rural el 83%.

La zona que mostró mayor cantidad de CF/20 ml de LBA, fue la NE (9.9 ± 8.66), pero esta diferencia fue significativa sólo cuando se comparó contra la zona SO (1.9 ± 1.9 ; $p = 0.02$) y contra la zona rural (1.17 ± 0.81 ; $p = 0.008$) (Fig.4 y Cuadro 5).

La zona NO también mostró un número mayor de CF que la zona de Lerma (4.04 ± 4.71 vs. 1.7 ± 0.81) siendo esta diferencia unimarginal ($p < 0.03$).

Las zonas en las que se identificaron mayor cantidad de CF típicos, fueron la SE y la NO, con un 46% y un 41% respectivamente. En los 3 restantes grupos, los CF típicos sólo constituyeron un 13% del total observado.

En la ciudad de México, se encontró un promedio general de 4.37 CF/20 ml de LBA, lo cual resultó significativamente más elevado que en la zona rural, en donde se detectaron en promedio 1.17 CF/20 ml de LBA ($p = 0.05$).

El número de CF/20 ml de LBA se relacionó en un 31% con los encontrados en 1 g de parénquima pulmonar previamente digerido. (Cuadro 6). Sin embargo,

el digerido pulmonar, mostró cifras absolutas mucho más elevadas que las encontradas en el LBA.

No se encontró relación entre el peso y la edad de los animales, y el número de CF que presentaron. Tampoco hubo relación entre la cuenta de ninguna de las células inflamatorias y la cantidad de CF observados en el LBA.

Al tratar de asociar el incremento de neutrófilos en la zona SO, con algún otro de los contaminantes atmosféricos, se encontró que el número de éstos se asocia en un 45% ($p=0.003$) con los altos niveles de ozono que prevalecieron durante casi todo 1994 en dicha zona, y que corresponden en promedio a 0.238 ppm., rebasando la norma de 0.111 ppm la mayoría del tiempo (Cuadro 7).

También se encontró una grado de asociación del 41% ($r=0.4078$, $p=0.02$) entre los CF/20ml de LBA y el número de PM10 que reporta la RAMA para cada una de las zonas de la Cd. de México; esta relación aumentó al 49% (0.4878 , $p=0.004$) en el caso de los CF/g de tejido pulmonar (Cuadro 7).

Estudio post-mortem de la cavidad torácica.

En las necropsias realizadas a los 42 perros, no se apreciaron cambios macroscópicos en ninguno de los pulmones, ni lesiones sugestivas de fibrosis, mesotelomas, u otro tipo de tumor con los que se ha asociado la presencia de CF.

Estudio histopatológico.

En los cortes de tejido pulmonar, se observó un engrosamiento moderado de la pleura, en el 40% de los perros de la zona NO y SE, en el 29% de los de la zona NE, en el 25% de los de la zona SO, y en ninguna de las biopsias de los animales de la zona rural; estos hallazgos no guardan relación individual con la cantidad de CF típicos observados en los LBA de cada animal, pero si se observó una asociación ($r=0.73$, $p=0.02$) entre el porcentaje de CF típicos observados en cada zona, y el número de animales que presentan engrosamiento de la pleura. No obstante, no se encontró relación entre el número de CF totales (típicos y atípicos) y el engrosamiento pleural.

Tampoco se demostró correlación entre el tipo y presencia de inflamación en el tejido pulmonar y bronquial, con las cuentas de neutrófilos y linfocitos en el LBA.

CUADROS Y FIGURAS

CUADRO N° 1

**PESOS Y EDADES PROMEDIO DE
LOS PERROS DE CADA GRUPO.**

ZONA	PESO (Kg)	EDAD (años)
NOROESTE	12.7 (7.8)	5.8 (2.8)
NORESTE	25.6 (7.1)	5.2 (2.6)
SURESTE	15.2 (3.6)	6.5 (2.7)
SUROESTE	15.7 (5.8)	5.2 (2.8)
RURAL (LERMA)	11.3 (3.5)	4.2 (2.5)

CUADRO N° 2

PROMEDIO DE CELULAS INFLAMATORIAS TOTALES EN EL LBA
DE PERROS DE 4 ZONAS DE LA CD. DE MEXICO, Y DE UNA ZONA RURAL

ZONA	Cél. totales por ml de LBA	Error estándar
NOROESTE	327,000	38,883
NORESTE	339,429	67,816
SURESTE	346,300	32,602
SUROESTE	467,333	93,403
RURAL (LERMA)	360,333	94,228

Nota: LBA = Lavado bronquioloalveolar

CUADRO N° 3

**PROMEDIO DE CELULAS INFLAMATORIAS/ml DE LAVADO
BRONQUIOLOALVEOLAR, EN PERROS DE 4 ZONAS DE
LA CIUDAD DE MEXICO Y DE UNA ZONA RURAL**

ZONA	MACROFAGOS 10 ³ por ml	LINFOCITOS 10 ³ por ml	NEUTROFILOS 10 ³ por ml
NOROESTE	224,6	81,7 +	19,0 ■
NORESTE	189,7	140,1	7,7 * *
SURESTE	248,4	79,9 †	17,0
SUROESTE	287,6	143,0 † +	32,8 * *
RURAL	244,6	102,1	8,8 *

+) p < 0.05
++) p < 0.05

*) p < 0.04
**) p < 0.04

■) p < 0.04

CUADRO N° 4**% DE CELULAS INFLAMATORIAS EN EL LAVADO
BRONQUIOLOALVEOLAR DE PERROS**

ZONA	Macrófagos %	Linfocitos %	Neutrófilos %	Eosinóf. %
NOROESTE	69	25	5.5	0.5
NORESTE	56	41	2	0.45
SURESTE	71	23	5	0.2
SUROESTE	62	30	7	0.8
RURAL	68	28	2	1.0

CUADRO N° 5**CUERPOS FERRUGINOSOS/20 ml DE
LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR**

ZONA	PROMEDIO ± D.E.		PORCIENTO
NORESTE	9.9 (8.66)	*+	44
NOROESTE	4.04 (4.71)		26
SURESTE	3.06 (2.14)		15,5
SUROESTE	1.9 (1.96)	*	10
RURAL	1.17 (0.81)	+	4,5

* p=0.02

+ p=0.008

CUADRO N° 6

**PORCENTAJE DE CF EN LBA Y EN
TEJIDO PULMONAR DE PERROS**

ZONA	CF/20 ml LBA %	CF/g TEJ. PULM. %
NORESTE	44	50
NOROESTE	26	20
SURESTE	15,5	15
SUROESTE	10	13
RURAL	4,5	2

NOTA: CF = Cuerpos fúngicos
LBA = Lavado bronquioalveolar

CUADRO N° 7**NIVELES PROMEDIO DE OZONO Y PARTICULAS
RESPIRABLES, DURANTE 1994, EN 4 ZONAS
DE LA CIUDAD DE MEXICO.**

ZONA	OZONO ppm	PARTICULAS $\mu\text{g}/\text{m}^3$	NEUTROFILOS $\times 10^3/\text{ml}$	CF EN 20 ml LBA
NOROESTE	225	123	19,0	4,04
NORESTE	141	134	7,7	9,9
SURESTE	178	46	17,0	3,06
SUROESTE	238	65	32,8	1,9

NOTA: Los niveles de ozono y partículas suspendidas, fueron tomados de los reportes de las Redes de Monitoreo Atmosférico, publicados por la Comisión Metropolitana para la prevención y control de la contaminación en el Valle de México (1994).

CUADRO N° 8

PRINCIPALES INDUSTRIAS EN LA CIUDAD DE MEXICO.

	NOROESTE	NORESTE	SURESTE
HILADOS Y TEXT.	8	2	0
FUNDIDORAS	9	9	0
METALURGICAS	15	11	1
HULERAS	3	2	0
VIDRIERAS	2	1	0
CERAMICAS	1	3	1
MINERALES	2	2	0

FUENTE: Programa para el control de emisiones contaminantes de la industria. Proporcionado por la Comisión Metropolitana para la prevención y control de la contaminación en el Valle de México (1984).

CUADRO N° 9

**CUADRO COMPARATIVO DE LA CUENTA
CELULAR EN EL LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR
EN PERROS.**

AUTOR	VANDA	REBAR	HAWKINS	MAYER
CEL.TOT./ml	369,861	470,000	200,000	8,284,000
%MACROFAGOS	66	83	78	47
%LINFOCITOS	28	6	7	37
%NEUTROFILOS	5	6	5	1,3
%EOSINOFILOS	0,4	3	6	0

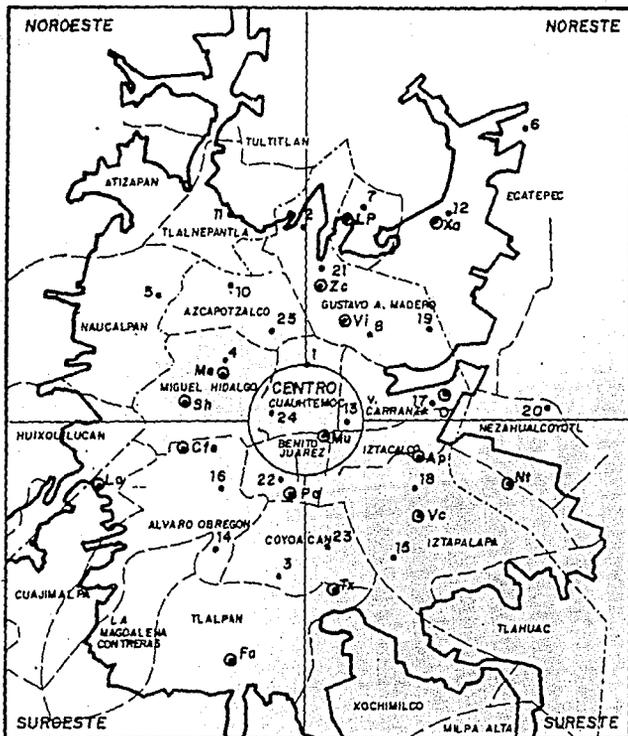


FIGURA 1.

Mapa de la zona metropolitana de la ciudad de México, en donde se muestran las principales estaciones de monitoreo atmosférico en las diferentes zonas.

CELULAS TOTALES EN LBA

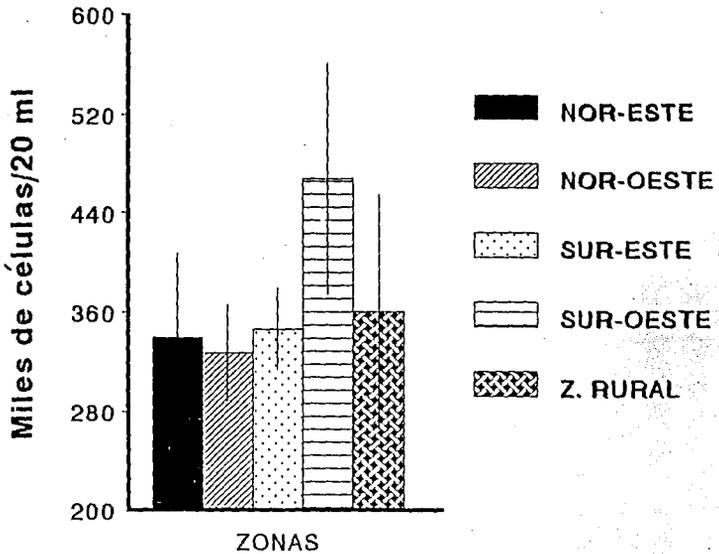


FIGURA 2.

Cuenta total de células inflamatorias en el lavado bronquioloalveolar (LBA) de perros de diferentes zonas. Las barras muestran los valores promedio de cada grupo, y las líneas verticales, el error estándar. Ninguna comparación mostró diferencias significativas.

CUENTA DIFERENCIAL CELULAR EN LBA

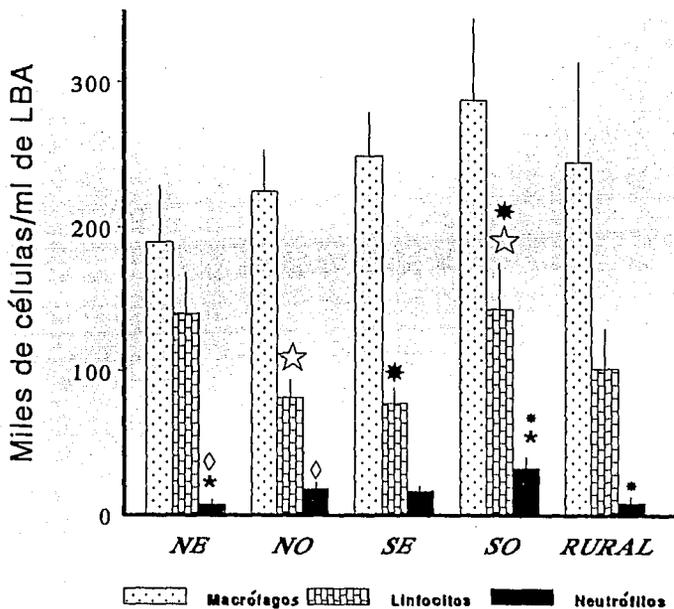


FIGURA 3.

Cuenta diferencial de células inflamatorias en el lavado bronquioloalveolar (LBA) en perros. Las barras representan los valores promedio de cada zona. Entre los macrófagos no se observaron diferencias significativas.

★) $p < 0.05$ *) $p < 0.02$ ◇) $p < 0.04$

☆) $p < 0.05$ *) $p < 0.04$

CUERPOS FERRUGINOS EN LBA

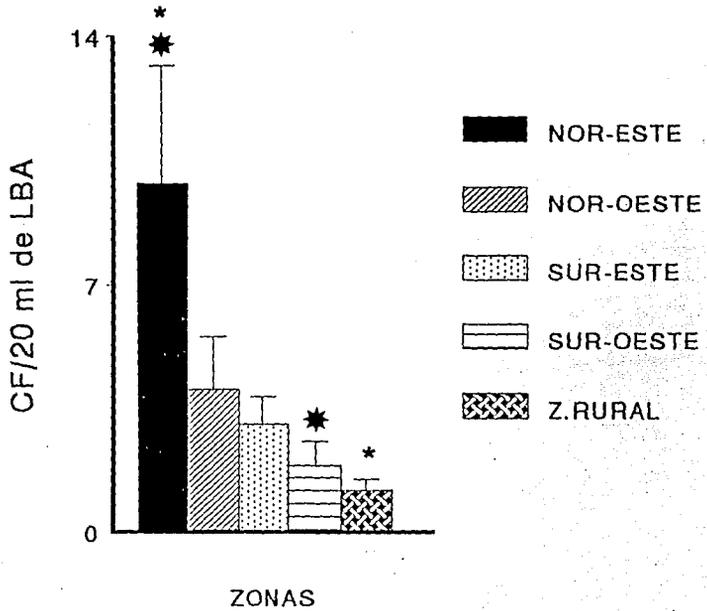


FIGURA 4.

Cuenta de cuerpos ferruginos (CF) recuperados en el lavado bronquioloalveolar (LBA) de perros de diferentes zonas. Las barras representan el promedio de cada grupo, y las líneas verticales, el error estándar.

*) $p=0.008$

**) $p=0.02$

CUERPOS FERRUGINOSOS EN LBA

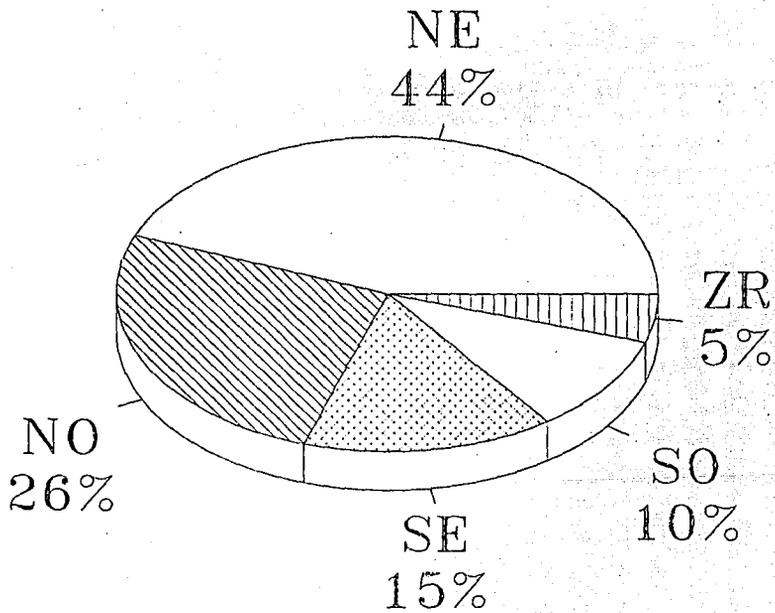


FIGURA 5.

DISCUSION

Al comparar las cuentas celulares de los LBA, con lo que menciona la literatura, en perros de otros países, Hawkins³⁵ reporta un promedio de 200,000 células totales/ml, mientras que Rebar⁶¹ reporta 470,000/ml; y hablando en porcentaje de cada tipo celular, el primero obtuvo un 78% de macrófagos, 7% de linfocitos, 5% de neutrófilos y 6% de eosinófilos. Mientras que Rebar observó 83% de macrófagos, 6% de linfocitos, 6% de neutrófilos y 3.6% de eosinófilos (Cuadro 9). En el presente estudio, se obtuvo un promedio de 370,000 células totales/ml, constituidas por un 66% de macrófagos, 28% de linfocitos, 5% de neutrófilos y sólo 0.5% de eosinófilos, es decir, que las células totales observadas, se encuentran dentro de los mismos rangos reportados en perros de otros países, pero en la ZMCM, se obtuvieron menores porcentajes de macrófagos y mayor porcentaje de linfocitos en comparación con muchas de las referencias extranjeras (Cuadro 9). Esto pudiera explicarse porque probablemente, en México, los perros están expuestos a un mayor estímulo antigénico a nivel de aparato respiratorio, y por ello, los valores de sus linfocitos están elevados respecto a otros países.

Es pertinente señalar, que dado que se trata de LBA efectuados en animales clínicamente sanos, estos valores pueden tomarse como parámetro normal para LBA de perros en la ciudad de México, y que hasta la fecha, no se contaba con datos ni referencias nacionales.

En LBA realizados por Sansores y col. (1990), en seres humanos en México, se tienen como valores normales en sujetos sanos, los siguientes: macrófagos 94%, linfocitos 2% y neutrófilos 2%; sin embargo, llama la atención que los porcentajes observados en los perros guardan bastante semejanza con lo que se encontró en contactos asintomáticos de pacientes con enfermedades intersticiales: macrófagos 72%, linfocitos 21% y neutrófilos 6%.

Diversos autores mencionan que entre la 1ª y las 3 horas post-exposición a fibras de asbesto, ocurre un incremento en el número de macrófagos alveolares a

nivel de las bifurcaciones de los ductos alveolares,⁹ situación que prevalece hasta por 24 horas si la exposición al asbesto se prolonga; sin embargo, no encontraron aumento en el número total de macrófagos alveolares,⁷⁵ de modo que lo que sucede, es que estas células se concentran en sitios específicos del árbol bronquial, en respuesta a factores quimiotácticos activados por la presencia de las fibras de asbesto.⁷⁶ Esto explica en parte, el por qué en el presente estudio, no se observó modificación en la cuenta total de macrófagos en los LBA de los animales que tuvieron altos niveles de CF.

En lo que respecta a las demás células inflamatorias, la zona SO, que presentó el mayor porcentaje de neutrófilos, mostró al mismo tiempo, las cifras más bajas de CF en el aparato respiratorio de los perros del Distrito Federal; sin embargo, se observó una correlación entre los picos de gases contaminantes y las cuentas de neutrófilos, ya que en la zona SO se registraron los niveles más elevados de dióxido de nitrógeno y de ozono/hora, durante todo 1994, manteniéndose niveles promedio entre 0.155 y 0.388 ppm para el primero, y entre 0.163 y 0.238 ppm para el segundo, estas cifras rebasan la norma de la calidad del aire que es de 0.210 ppm para el dióxido de nitrógeno y de 0.111 para el O₃.¹⁷ Esto es debido principalmente, a que la gran cantidad de gases contaminantes que se generan en el norte de la ciudad, tales como el dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre e hidrocarburos, son llevados por acción de los vientos dominantes, hacia la zona suroeste en donde permanecen, ya que quedan "cercados" por las montañas que rodean al Valle de México.⁸ Todos estos gases, además de ser nocivos *per se*, y de provocar inflamación neurofílica,³⁹ son precursoras del O₃.

La siguiente zona más contaminada por dióxido de nitrógeno y por O₃, fue el NO, misma que también ocupó el 2º lugar en la cuenta de neutrófilos (Cuadro 7).

Con los datos anteriores, puede decirse, que los altos niveles de O₃ y de sus precursoras, se encuentran relacionados de algún modo con el aumento en la cuenta neurofílica pulmonar ($r=0.44$, $p=0.003$), tal como lo mencionan las investigaciones de Segura y col.⁶⁶

Sin embargo, la presencia de CF en el aparato respiratorio, no guardó relación con la cantidad de los diferentes tipos de células inflamatorias.

Cuando se compararon los porcentajes de células inflamatorias en los LBA del Distrito Federal, contra los de la zona rural, la única diferencia significativa se observó, entre los neutrófilos, que fueron del 5.2% y del 2.3% respectivamente.

En un informe emitido por la Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México, ¹⁷ se muestra que durante 1994, la zona NE presentó la concentración máxima de partículas suspendidas respirables (PM10), rebasando la norma de la calidad del aire en más de 2 ocasiones por mes, con un promedio de 123 µg/m³ de PM10, ¹⁷ ésta fue seguida por la zona NO, en donde también se llegó a rebasar la norma. Estos datos apoyan los resultados que obtenidos en la presente investigación, en donde se muestra que los animales que presentaron el mayor número de CF también corresponden a la zona NE, seguidos por los de la NO (Cuadro 7). Dado que en dichas zonas es donde se localizan la mayoría de las industrias siderúrgicas, fundidoras, huleras, vidrieras y textiles del Distrito Federal (Cuadro 8), se pudo demostrar también, que el número de CF encontrados en el aparato respiratorio de los perros fue dependiente del número de fábricas de la zona (p=0.02).

En la zona NO, donde se localiza el mayor número de fábricas en la ciudad de México, (alrededor de 25 metalúrgicas y fundidoras, 8 de hilados y textiles, 3 huleras, y 4 de vidrios y cerámicas) (Cuadro 8) fue donde se encontró un elevado porcentaje de CF típicos (41%).

La localización de las principales industrias de la ZMCM es la siguiente: ¹⁷

Zona NE	Zona NO	Zona SE
Agrícola Oriental	Industrial Vallejo	Iztapalapa
Aragón	Tlalnepanla	
Carretera Méx.-Puebla	Naucalpan	
Los Reyes	Sn Bartolo Tenayuca	
Pantillán	Sn Juan Ixhuatepec	
Santa Clara	Sn Pedro	
Xalostloc	Cuautitlán	

Las zonas que presentaron las menores concentraciones de CF en el aparato respiratorio, como fue el caso del SO y la zona rural, prácticamente no poseen industrias; también cabe resaltar, que los CF observados en los animales de estas zonas, corresponden en un 87% a CF atípicos, los cuales, como ya se ha

mencionado, se originan a partir de carbón, cenizas, diatomeas terrestres y partículas de polvo procedentes de tolveneras o de áreas erosionadas,^{17,62} y son el tipo de CF más frecuente en los perros. En tanto que en los humanos, los CF que se encuentran en mayor cantidad y frecuencia, son los típicos.^{2,12,14} Esto puede deberse a varios factores: primero, por el hecho de que los animales no tienen exposición laboral al asbesto ni a los polvos usados en maquillajes, a los que sí se exponen humanos, y que dan origen a la formación de CF atípicos.

Por otro lado, los perros tienen el hábito de estar hozando y olfateando continuamente el pasto, y el suelo, lo que provoca que inhalen mayor cantidad de tierra y diatomeas; además por su estatura, están más cerca del nivel del suelo y el tubo de escape de los automóviles y camiones queda justo a nivel de su nariz, provocando que las partículas de hidrocarburos penetren directamente en su aparato respiratorio y dando lugar a la formación de CF atípicos.

En ninguno de los animales se encontró evidencia de neoplasias en la pleura o pulmón, ni tampoco fibrosis. Ni aún los animales de la zona NE, quienes tuvieron la mayor cantidad de CF, presentaron lesiones sugestivas. En los humanos, algunos autores han observado asociación entre cuentas elevadas de CF y tumores malignos de la pleura,^{8,41,42,77} pero siempre en exposiciones intensas crónicas, es decir, con un tiempo de exposición que va de 25 a 30 años,^{8,44} y la mayoría de las veces, relacionadas con la ocupación de las personas, ambas cosas es difícil que ocurran en nuestros perros, tanto por su longevidad, pues no alcanzan a vivir el tiempo suficiente para desarrollar la neoplasia, como porque no es común que estos animales frecuenten fábricas ni minas. Arenas y Castro mencionan no haber encontrado tumores asociados a CF en pulmones de personas menores de 41 años de edad.¹¹ Por otro lado, los CF que se han asociado a mesoteliomas y otras neoplasias, son los CF típicos, especialmente los que se forman a partir de los anfíboles de importancia comercial,¹² a los que los humanos se exponen en sus sitios de trabajo.

Otro factor importante para el desarrollo de tumores y enfermedades intersticiales del pulmón, es el tamaño y la forma de la fibra de asbesto.⁴⁴ En los perros, la mayoría de CF encontrados, correspondieron a los llamados atípicos, es decir, que no están constituidos por asbesto.

Algunos autores mencionan no haber encontrado relación entre la cantidad de CF en pulmón, y la presencia de tumores malignos,^{2,79} sin embargo, no puede

ponerse en duda las consecuencias dañinas que provoca la inhalación de partículas, independientemente de su naturaleza, ya que éstas transportan en su superficie, tóxicos como son los vapores de metales pesados (plomo, cadmio, berilio, cobre, cobalto y mercurio), y gases como el dióxido de azufre y de nitrógeno, y les facilitan la entrada al aparato respiratorio, magnificándose en ese sitio, la acción agresora de dichos agentes.^{32,55}

El límite permisible de CF en tejido pulmonar, propuesto por Churg y Kishimoto, es de 100 CF/g.^{12,43} Arenas reportó que en 1988, el número promedio de CF/g de tejido pulmonar, en habitantes del D.F., fue de 17 a 100 en sujetos sin exposición ocupacional,³ quienes pasaban la mayoría del tiempo en casas u oficinas; y más de 1,000 CF/g en personas de alto riesgo de exposición como son los mineros, carpinteros y trabajadores de la construcción, estas cifras contrastan con el promedio de CF/g que encontró en residentes de provincia, y que fué de 8.5. Además observó que la concentración de CF en el pulmón, tampoco guardaba relación con la edad de los individuos,^{1,3} ni con la presencia de cáncer pulmonar,² aunque sí con su ocupación. A pesar de que no se existen cifras de cuentas de CF en perros de México en años anteriores, el hecho de que para 1994, se hayan encontrado en el tejido pulmonar de perros del Distrito Federal, cuentas promedio de 784 CF/g,³³ nos indica que la exposición ambiental a las partículas se ha incrementado en forma notable, sobre todo si se comparan con los reportes de hace 6 años en seres humanos.

La información que proporcionaron los pulmones y lavados bronquiales de estos perros que fueron empleados como "monitores", no es un indicador de riesgo ocupacional, pero sí es un buen indicador de exposición ambiental de acuerdo a cada zona, cosa que no se había reportado anteriormente y que debe ser considerada, ya que demuestra que la exposición ambiental a PM10 es mayor de lo que se piensa, y no debe subestimarse.

El LBA, fue mucho menos sensible para detectar CF, que la biopsia pulmonar, tal como se constató al comparar estos resultados con los hallazgos en el digerido de pulmón de los mismos animales, en los que Guallo³³ encontró un promedio de 1,595 CF/g en la zona NE, 642 CF/g en la zona NO, 482 CF/g en el SE, 420 CF/g en el SO y 11 CF/g en la zona rural de Lerma. Sin embargo, el LBA tiene la ventaja de ser un método menos invasivo, que puede emplearse sin riesgo en

sujetos vivos, sin comprometer su vida o su estado de salud; y al mismo tiempo, resulta confiable, ya que la información obtenida mediante esta técnica, coincide con lo que se observó en el tejido pulmonar; por este motivo, puede usarse como herramienta diagnóstica en pacientes con cambios radiológicos sugestivos de asbestosis o alguna enfermedad relacionada con ello.²³

No hay que olvidar que el efecto de los contaminantes no puede ser estudiado en forma aislada, ya que en las ciudades con altos índices de contaminación atmosférica, los sujetos inhalan un aire constituido por la mezcla de muy diversos contaminantes, sólidos y gases, que actúan sinérgicamente, potenciando su efecto agresor sobre el organismo.

CONCLUSIONES

- Los perros constituyen un excelente modelo para estudiar el grado y los efectos de la exposición natural a los contaminantes atmosféricos, ya que de acuerdo al tipo de contaminante que predomine en el ambiente al que están expuestos, presentarán una determinada respuesta.
- Los perros de la zona noreste de la ciudad de México, presentaron la mayor cantidad de CF en el LBA, seguidos por los de la zona noroeste; ambas zonas corresponden a aquellas donde se localizan la mayoría de las fábricas y donde se registraron los niveles más altos de PST.
- En la zona rural de Lerma, Edo. de México, en donde no existen industrias, se detectó la menor cantidad de CF, y la mayor parte de ellos fueron atípicos.
- La zona que mostró las cifras más elevadas de neutrófilos y linfocitos en los LBA, fue la zona suroeste de la ciudad de México, misma en donde prevalecieron los niveles más altos de ozono y de dióxido de nitrógeno durante 1994.
- Los registros de la calidad del aire en la ZMCM, estuvieron estrechamente relacionados con lo que se observó en el aparato respiratorio de los perros.
- El número de CF, así como el tipo y cantidad de células inflamatorias en el LBA, no guardaron relación con la edad y el peso de los animales. La presencia de CF tampoco se relacionó con la cuenta de las células inflamatorias del pulmón.
- El LBA fue menos sensible para detectar CF, que el estudio del tejido pulmonar, sin embargo los resultados obtenidos por ambos métodos, guardaron una alta correlación entre sí.
- La presencia de CF en el pulmón, son un marcador de exposición ambiental a estas partículas contaminantes, y no un indicador de enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arenas, F.J. y Osornio, A.R.: Cuantificación de cuerpos ferruginosos en pulmones humanos de 90 casos de autopsia. Patología, **28**:51-54 (1990).
2. Arenas, F.J., Ramírez, A., Osornio, A., Pasquel, P., Montoya, B.A., y Salazar M.: Presencia de cuerpos ferruginosos en tejido pulmonar canceroso. Salud Publ. Méx., **34**:449-454 (1992).
3. Arenas, F.J.: Identificación de cuerpos ferruginosos en pulmones humanos. Estudio retrospectivo de 1975, 1982 y 1988. Salud Publ. Méx., **32**:644-652, (1990).
4. Auerbach, O., Conston, S.A., Garfinkel, L., Parks, R.V., Kaslow, D.H. y Hammond, C.E.: Presence of Asbestos bodies in organs other than the lung. Chest, **77**:2, (1980).
5. Barrios, R., Selman, M., Ramos, C., Montaña, M., Zepeda, A. y Fortoul, T.: Respuesta tisular en la silicosis experimental. Microscopía electrónica de barrido. Rev. Fac. Med. UNAM, **28**:182, (1985).
6. Becklake, M.R.: Asbestos-related diseases of the lung and their epidemiology and implications for clinical practice. Am. Rev. Respir. Dis., **114**:187-227 (1976).
7. Benjamin, M.M.: Manual de patología clínica en veterinaria. 1ª edición. Ed. Limusa, pp.64-66. México, 1984.
8. Bravo, A.H., Sosa, E.R. and Torres J.R.: Ozono y lluvia ácida en la ciudad de México. Rev. Ciencias, **22**:33-40 (1991).
9. Brody, A.R., Hill, L.H., Adkins, B. Jr., O'Connor, R.W.: Chrysotile asbestos inhalation in rats: deposition pattern and reaction of alveolar epithelium and pulmonary macrophages. Am. Rev. Respir. Dis., **123**:670-679 (1982).
10. Campos, M.G., Segura, P., Vargas, M.H., Vanda, B., Ponce, H., Selman, M. y Montaña, L.M.: O₃-Induced Airway Hyperreactivity to Non-Cholinergic System and Other Stimuli: An In Vivo and In Vitro Study. J. Appl. Physiol., **73** (1): 354-361, (1991).
11. Castro, F., Arenas, F., Salazar, M. and Osornio A.: Modification of the Smith and Naylor technique for the identification of ferruginous bodies. Arch. Med. Res., **24** (2): 199-201 (1993).
12. Churg, A. and Warnock, M.L.: Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population. Patients with environmental exposure. Lab. Invest., **40**:622-626 (1979).
13. Churg, A. and Warnock, M.L.: Asbestos fibers in the general population. Am. Rev. Respir. Dis., **122**: 669 (1980).

14. Churg, A., Warnock, M.L. and Green, N.: Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population. True asbestos bodies and pseudoasbestos bodies. Lab. Invest., **40**:31-37 (1973).
15. Churg, A.: Current issues in the pathologic and mineralogic diagnosis of asbestos-induced diseases. Chest, **84**:275 (1983).
16. Churg, A.: Fiber counting and analysis in the diagnosis of asbestos-related disease. Hum. Pathol., **13**:381-392 (1982).
17. Comisión metropolitana para la prevención y control de la contaminación ambiental en el Valle de México: Informes mensuales de la calidad del aire. Red de monitoreo atmosférico de la zona metropolitana de la Ciudad de México. (1994).
18. Craighead, J.E.: Asbestos-associated diseases. Arch. Pathol. Lab. Med., **106**:544, (1982).
19. Crystal, R.G., Reynolds, H.Y. and Kalica, A.R.: Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. Chest, **90**:122, (1986).
20. Daniel, W.E.: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1ª edición. Ed. Limusa, pp. 244-274. México, D.F. 1977.
21. De Buen, N., Alonso, P., y Orozco, H.: Cuerpos ferruginosos en pulmón de perro. Neumol. Cir. Tórax. Méx., **45**:39, (1984).
22. De Vuyst, P., Dumortier, P., Léophonte, P., Vande, R., and Yernault, J.C.: Mineralogical analysis of bronchoalveolar lavage in talc pneumoconiosis. Eur. J. Respir. Dis., **70**:150-156 (1987).
23. De Vuyst, P., Dumortier, P., Moulin, E., Yourassowsky, N. and Yernault, J.C.: Diagnostic value of asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid. Am. Rev. Respir. Dis., **136**:1219-1224 (1987).
24. De Vuyst, P., Dumortier, P., Moulin, E., Yourassowsky, N., Roomans, P., de Francquen, P. and Yernault, J.C.: Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage reflect lung asbestos body concentration. Eur. Respir. J., **1**:362-367 (1988).
25. De Vuyst, P., Mairesse, M., Gaudichet, A., Dumortier, P., Jedwab, J., and Yernault, J.C.: Mineralogical analysis of bronchoalveolar lavage fluid as an aid to diagnosis of "imported" pleural asbestosis. Thorax, **38**:628-629 (1983).
26. Editorial: Cosmetic talc powder. Lancet, **1**:1348 (1977).
27. Fuentes, G.V.: La contaminación por partículas suspendidas en la atmósfera del Valle de México. Rev. Ciencias, **22**:45-49 (1991).
28. García, D., Calzada, L.A., Martín, E., Jasso, R., Santillán, P. y Villalba, J.: Correlación broncoscópica y broncográfica de la anatomía traqueobronquial del perro. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. (Méx), **2**:28-35 (1989).

29. Gloag, D.: Asbestos-can it be used safely? Br. Med. J., 282:551 (1981)
30. Goldsmith, R.J., and Friberg, T.L.: Effects of air pollution on human health. En: Stern, C.A. Air pollution, 3ª ed., Vol II, pp. 458-590. Academic Press Inc, Florida, E.U.A., 1977.
31. Graham, J.A., Gardner, D.E., Waters, M.D. and Coffin, D.J.: effect of trace metals on phagocytosis by alveolar macrophages. Infect. Immun. 11:1278-1283 (1975)
32. Gross, P., Detreville, P.T.R., Cralley, J.L. and Davies, G.M.J.: Pulmonary Ferruginous bodies. Arch. Path. 85:539; (1968).
33. Gualito, J.J.: Determinación de cuerpos ferruginosos en pulmones de perros de la ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México, D.F. (1995)
34. Harbison, M.L. and Godleski, J.J.: Malignant mesothelioma in urban dogs. Vet. Pathol. 20:531-540 (1983).
35. Hawkins, E.C., DeNicola, D.B. and Kuehn, N.F.: Bronchoalveolar lavage in the evaluation of pulmonary disease in the dog and cat. J. Vet. Int. Med., 4:267-274 (1990).
36. Hendry, N.W.: The geology, occurrences and major uses of asbestos. Ann. N.Y. Acad. Sci. 135:12 (1965).
37. Hillerdal, G.: Pleural plaques: Occurrence, exposure to asbestos, and clinical importance. Acta Univ. Upsal. 363:47-48 (1980).
38. Hinshaw, H.C.: Enfermedades del tórax, 3ª ed., pág. 733. Nueva Editorial Interamericana, México, 1970.
39. Holtzman, M.J., Fabbri, L.M., O'Byrne, P.M., Gold, B., Aizawa, H., Walters, E., Alpert, S., Nadel, J.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. Am. Rev. Respir. Dis. 127:1059-1067 (1983).
40. Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. Am. J. Pathol. 97:149; (1979).
41. Jaurand, M.C.: Observations on the carcinogenicity of asbestos fibers. Ann. N.Y. Acad. Sci. 643:258-269 (1992).
42. Kannerstein, M., et al.; Asbestos and mesothelioma. Pathol. Annu. 13 (Part I):81, (1978).
43. Kishimoto, T. y Okada, K.: The relationship between lung cancer and asbestos exposure. Chest 94:486-490 (1988).

44. Kohyama, N. and Suzuki, Y.: Analysis of asbestos fibers in lung parenchyma, pleural plaques, and mesothelioma tissues of North American insulation workers. Ann. N.Y. Acad. Sci., 643:27-51 (1991).
45. Langer, A.M., Selkoff, I.J. and Sastre, A.: Chrysotile asbestos in the lungs of persons in New York City. Arch. Environ. Health., 22:348 (1971).
46. Legorreta, J.: Contaminación atmosférica en la ciudad de México. Rev. Ciencias, 22:53-62 (1991).
47. Lewis, R.T., Morrow, E.P., McClellan, O.R., Raabe, G.O. and Kennedy, L.G.: Establishing aerosol exposure concentrations for inhalation toxicity studies. Toxicol. Appl. Pharmacol., 99:377-383 (1989).
48. Linder, J., Radio, S.J., Robbins, R.A., Ghafouri, M. and Rennard, S.I.: Bronchoalveolar lavage in the cytologic diagnosis of carcinoma of the lung. Acta Cytol., 31:796, (1987).
49. Mayer, P., Laber, G. and Walzl H.: Bronchoalveolar lavage in dogs; analysis of proteins and respiratory cells. J. Vet. Med., 37:392-399 (1990).
50. McFadden, D., Wright, J.L., Wiggs, B. and Churg, A.: Smoking inhibits asbestos clearance. Am. Rev. Respir. Dis., 133:372-374 (1986).
51. Mendenhall, W.: Introducción a la probabilidad y la estadística. pp. 509-540. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F., 1987.
52. Montoya, M.A., Pérez, M.A., Alonso, P., Gutiérrez, M.D. y Maldonado, L.: Investigación de cuerpos ferruginosos en expectoración, de exposición a la inhalación de fibras de asbestos. Estudio comparativo de 3 técnicas de laboratorio para su identificación. Arch. Invest. Med. (Méx), 19:97-106 (1988).
53. Mossman, B.T. and Gee, B.L.: Asbestos related diseases. N. Engl. J. Med., 320:1721; (1989).
54. Muir, D.E.F.: Deposition and clearance of inhaled particles. In: Clinical Aspects of inhaled particles. Edited by Muir, D.E.F., pp. 1-3, William Heimann Medical Books, Londres, 1972.
55. Natusch, S.F.D., Wallace, J.R. and Evans, C.A.: Toxic trace elements: preferential concentration in respirable particles. Science, 183:202-204 (1974).
56. Osornio, A.R., Fortoul T., Cordero, M., Alvarez M.A. y Barrios, R.: Identificación de partículas contaminantes atmosféricas en pulmones humanos de casos de autopsia. I. Cuerpos ferruginosos. Patología, 21:109-123 (1983).
57. Parkes, W.R.: Asbestos-related disorders. Br. J. Dis. Chest, 67:261 (1973).
58. PEMEX: Programa integral contra la contaminación atmosférica. Un compromiso común. 75 pp. México, 1991.

59. Pinkerton, K.E., Brody, A.R., Miller, F.J. and Crapo, J.D.: Exposure to low levels of ozone results in enhanced pulmonary retention of inhaled asbestos fibers. Am. Rev. Respir. Dis., 140:1075-1081 (1989).
60. Pinsker, K.L., Norin, A.J., Kamholz, S.L., Montefusco, Ch., Schreiber, K., Hagstrom, J.W. and Veith, F.J.: Cell content in repetitive canine bronchoalveolar lavage. Acta Cytol., 24 (6):558-563 (1980).
61. Rebar, A.H., De Nicola, D.B. and Muggenburg, B.A.: Bronchopulmonary lavage cytology in the dog: Normal findings. Vet. Pathol., 17:294-304 (1980).
62. Rivero, O., Ponciano, G. y Fortoul, T.: Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria. Editado por la Secretaría de Salud y la Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 61-69. Fondo de Cultura Económica, México, 1993.
63. Rohl, A.N.: Asbestos in talc. Environ. Health Perspect., 9:129 (1974).
64. Roisier, K., Haschek, W.M., Hesterberg, T.W. and Last, J.: Experimental silicosis. II Long-term effects of intratracheally instilled quartz of collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lung. Am. J. Pathol., 110:30 (1983).
65. Saccomanno, G.: Diagnostic pulmonary cytology, pp. 6-10. Editor American Society of Clinicians Pathologists. Chicago, 1976.
66. Segura, P., Montaña L.M., Vanda, B., Bazán, B., Campos, P., Villarreal, J., Gustin, P. y Vargas, M.H.: Exposición aguda a diversas concentraciones de ozono en el cobayo: Correlación entre inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx., 7 (4):279-284 (1994).
67. Selikoff, I.J., Hammond, E.C. and Seidman, H.: Mortality experience of insulation workers in the United States and Canada. Ann. N.Y. Acad. Sci., 330:91-116 (1970).
68. Smialowicz, J.R., Rogers, R.R., Riddle, M.M. and Scott G.A.: Immunological effects of nickel. Suppression of natural killer cell activity. Env. Res., 36:56-66 (1985).
69. Smith, J.M. and Naylor, B.A.: Method for extracting ferruginous bodies from pulum and pulmonary tissue. A.J.C.P., 58:250-254 (1972).
70. Stanton, M.F., Layard, M., Tegeris, A., Miller, E., May, M., Morgan, E. and Smith, A.: Relationship of particle dimensions to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous minerals. J. Natl. Cancer. Inst., 67:965-975 (1981).
71. Suzuki, Y. and Churg, A.: Formation of the asbestos body: A comparative study with three types of asbestos. Environ. Res., 3:107 (1969).
72. Suzuki, Y. and Churg, A.: Structure and development of the asbestos body. Amer. J. Pathol., 55:79 (1969).

73. Teherani, D.K.: Determination of arsenic, scandium, chromium, cobalt and nickel in asbestos by neutron activation analysis. J. Radiat. Nucl. Chem., 95:177 (1985).
74. Thomson, H. and Pavia, D.: Particle penetration and clearance in the human lung. Arch. Environ. Health, 29:214 (1975).
75. Warheit, D.B., Chang, L.Y., Hill, L.H., Hook, G.E.R., Crapo, J.D. and Brody, A.R.: Pulmonary macrophage accumulation and asbestos-induced lesions at sites of fiber deposition. Am. Rev. Respir. Dis., 129:301-310 (1984).
76. Warheit, D.B., George, G., Hill, L.H., Snyderman, R. and Brody, A.R.: Inhaled asbestos activates a complement-dependent chemoattractant for macrophages. Lab. Invest., 52:505-514 (1985).
77. Warnock, M. and Isenberg, W.: Asbestos burden and the pathology of lung cancer. Chest, 89:20-26 (1986).
78. Weiss, W.: Cigarette smoking, asbestos and pulmonary fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis., 104:223, (1971).
79. Whitwell, F., Scott, J., Grimshaw, M.: Relationship between occupations and asbestos-fibre content of the lungs in patients with pleural mesothelioma, lung cancer and other diseases. Thorax, 32:377 (1977).