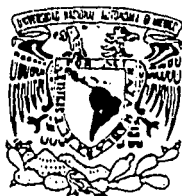


25/
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTOS PRESINAPTICOS Y POSTSINAPTICOS EN EL
MUSCULO LISO DE LAS VIAS AEREAS DEL COBAYO
DESPUES DE LA EXPOSICION AGUDA A OZONO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO
MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
MARIA EUGENIA BETINA
SOMMER CERVANTES

FALLA DE ORIGEN

A S E S O R E S :
DR. LUIS M. MONTAÑO R.
M. EN C. PATRICIA SEGURA M.
M.V.Z. LAURA P. ROMERO R.



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.

A Andrés, porque:

**"Tu risa me hace libre, me pone alas,
soledades me quita, cárcel me arranca..."**

**M. Hernández
Nanas de la Cebolla**

A Jeffito, por el susto.

A todos los amigos y hermanos que no menciono, pero que llevo conmigo.

AGRADECIMENTOS

A Luis M. Montaño, por su paciencia, entusiasmo y supervisión constante

A Patricia Segura por su apoyo desinteresado

A Laura Romero por su crítica constructiva

A los miembros del Laboratorio de Investigación en Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S, en especial a María G. Campos y Blanca M. Bazán.

CONTENIDO

PAGINA

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	19
LITERATURA CITADA.....	23
CUADROS Y FIGURAS	31

RESUMEN

SOMMER CERVANTES, MARÍA EUGENIA BETINA. Efectos Presinápticos y Postsinápticos en el Músculo Liso de las Vías Aéreas del Cobayo después de la Exposición Aguda a Ozono (bajo la dirección de Luis M. Montaña R., Patricia Segura M. y Laura P. Romero R.)

El ozono (O_3) es un contaminante atmosférico que genera hiperreactividad de las vías aéreas. Esta hiperreactividad se manifiesta como un aumento de la respuesta de contracción del músculo liso traqueobronquial ante estímulos que normalmente no producen respuesta. El propósito de este trabajo fue evaluar si la exposición aguda a O_3 desencadena en las vías aéreas del cobayo respuestas presinápticas a concentraciones de ozono a las que los efectos postsinápticos no son perceptibles. Se usaron cobayos criados en condiciones libres de ozono los cuales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 6 y fueron sometidos por 4 h a 0 (control), 0.3, 0.6 ó 1.2 ppm de O_3 . Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital y se obtuvieron 4 anillos traqueales y 2 bronquiales. Cada anillo se colocó en una cámara de órganos aislados con 10 ml de Solución de Krebs. Las preparaciones fueron sometidas a trenes de estimulación eléctrica (estimulación de campo) de 100 volts, 2 ms, durante 10 segundos a 16, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 Hz en orden progresivo. Algunas preparaciones bronquiales fueron incubadas con atropina ($2\mu M$) y las tráqueas con atropina ($2\mu M$) o con atropina ($2\mu M$) y propranolol ($10\mu M$) antes de la estimulación eléctrica de campo. Finalmente se hicieron curvas acumulativas concentración respuesta al carbacol (Cch) desde 10^{-8} hasta $10^{-6} M$, y los resultados fueron expresados como el $-\log$ de la concentración efectiva 50% (CE_{50}) y como respuesta máxima. La estimulación eléctrica de las tráqueas produjo una respuesta bifásica, es decir, se observó primero una contracción y luego la relajación. Esta respuesta bifásica fue dependiente de la frecuencia del estímulo eléctrico. La exposición previa a todas las concentraciones de O_3 produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) de la relajación inducida por la estimulación eléctrica a 0.5 y 1 Hz. La estimulación eléctrica de las preparaciones bronquiales ocasionó únicamente una respuesta de contracción la cual también fue dependiente de la frecuencia. La exposición a O_3 generó, sólo a 0.6 ppm, un incremento significativo en la respuesta de contracción bronquial inducida por la estimulación eléctrica a 16 Hz, independientemente de si estos tejidos fueron incubados con o sin atropina. La adición de Cch a los tejidos traqueales y bronquiales produjo una respuesta de contracción dependiente de la concentración empleada. La exposición a ozono no modificó la CE_{50} al carbacol, pero incrementó significativamente ($p < 0.05$) las respuestas máximas en ambas preparaciones. En este sentido, las preparaciones bronquiales fueron más sensibles al efecto del ozono (0.6 ppm). Puede concluirse que en las vías aéreas de cobayo, la exposición previa a concentraciones bajas de O_3 (0.3 ppm) inhibe la liberación de los mediadores químicos responsables de la relajación (probablemente noradrenalina y péptido vasoactivo intestinal) y que son necesarias concentraciones de O_3 más altas (0.6 ó 1.2 ppm) para poder observar efectos postsinápticos.

INTRODUCCION

El Valle de Anáhuac ha dejado de ser, desde hace tiempo, la "región más transparente". Hoy, este valle encierra a la Zona Metropolitana de la Ciudad de México que se localiza en la parte suroeste de una cuenca cerrada a $19^{\circ}35'$ de latitud norte, $99^{\circ}40'$ de longitud oeste, y a una altitud de 2240 metros sobre el nivel del mar. Está rodeada por montañas lo cual propicia la circulación de vientos débiles provenientes del noroeste-noreste. A las condiciones geográficas se suman las emisiones de contaminantes atmosféricos producidos por las actividades de 20 millones de habitantes, más de 2.5 millones de vehículos y 25% de la industria del país. La situación geográfica y las emisiones de contaminantes conforman las condiciones de un gran recipiente natural en el que se desarrollan complejas reacciones fotoquímicas. La contaminación atmosférica, conocida como smog (del inglés "smoke": humo, y "fog": niebla), es una mezcla de varios compuestos químicos, principalmente óxidos de nitrógeno (NO_x), hidrocarburos reactivos, ozono (O_3) y partículas suspendidas. (15)

El ozono, forma alotrópica del oxígeno, es un gas azulado, tóxico, fuertemente oxidante, de olor penetrante similar al cloro. Es un contaminante secundario que se forma en la atmósfera a través de una serie compleja de reacciones químicas de los contaminantes primarios o precursores. Las fuentes de emisión de precursores antropogénicos son los automóviles (NO_x , hidrocarburos reactivos), la industria (NO_x , hidrocarburos reactivos), expendios de gasolina (hidrocarburos reactivos) y las actividades en que se emplean solventes químicos como pintura y productos para limpieza (74). Las reacciones que generan ozono son llamadas fotoquímicas porque dependen de la radiación solar. Uno de sus precursores, el dióxido de nitrógeno (NO_2), absorbe eficientemente la energía ultravioleta del sol. Esta interacción provoca una reacción fotolítica; la molécula de NO_2 se disocia en NO y O_2 , un átomo de oxígeno altamente reactivo que se une con la molécula de oxígeno (O_2) y forma el ozono (O_3) contaminante. (Figura 1).

De acuerdo con el ciclo fotolítico, el O_2 y el NO deberían disociarse estequiométricamente, pero no sucede así, ya que intervienen los hidrocarburos reactivos, provocando reacciones que rompen el equilibrio del ciclo, es decir, generan contaminación.

(Figura 2)

El denso tránsito automovilístico matutino de esta gran urbe, promueve el aumento de estos fotooxidantes de manera que el pico de ozono atmosférico se puede observar al medio día o por la tarde temprana cuando el sol brilla más intensamente.

El ozono contaminante de la atmósfera nada tiene que ver con la estratósfera; son dos eventos independientes. Es necesario recordar que en la estratósfera existe una capa de ozono que funciona como filtro natural absorbiendo la radiación ultravioleta de los rayos solares.

En 1985, el gobierno mexicano, a través de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE), (75) actualmente SEDESOL, implementó el Índice Metropolitano de Calidad del Aire (IMECA) para informar a la población de la Ciudad de México acerca de los niveles de contaminación atmosférica. Esta unidad no internacional, el IMECA, mide la calidad del aire respecto a:

1. Partículas sólidas en suspensión ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
2. Bióxido de azufre (ppm)
3. Ozono (ppm)
4. Monóxido de carbono (ppm)
5. Oxidos de nitrógeno (ppm)
6. Un término que mide la acción sinérgica del bióxido de azufre con las partículas sólidas en suspensión. (Partículas totales en suspensión \times SO_2).

Con respecto a las mediciones de ozono, los IMECAS derivan de las unidades ppm (partes por millón) y, como se puede apreciar en la Figura 3, existe una relación lineal con respecto a estas últimas unidades. El Cuadro 1 muestra las equivalencias de la concentración atmosférica de ozono en ppm con respecto al IMECA.

El Cuadro 2 describe algunos de los principales contaminantes atmosféricos y sus efectos sobre la salud. En este sentido, en la Ciudad de México se han establecido recomendaciones generales a la población de acuerdo a los niveles de contaminación ambiental presentes diariamente (Cuadro 3).

Se ha establecido que la concentración máxima de exposición a ozono a la que puede estar

sujeto el hombre sin que se presenten efectos tóxicos es de $235 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.12 ppm), valor que constituye un promedio por hora que no debe exceder más de una vez por año (82), mientras que la norma mexicana reconoce valores inferiores a 0.11 ppm como tolerables. En este contexto, se ha informado que desde hace varios años las concentraciones de ozono en la Ciudad de México frecuentemente superan la concentración máxima permisible, y en los últimos años esto ha ocurrido casi todos los días, alcanzándose en ocasiones concentraciones superiores a 0.4 ppm, por lo que sus consecuencias sobre la salud humana y animal son fenómenos que merecen detallado estudio. (75)

El daño biológico producido por el ozono en el organismo humano y animal aún no está claramente definido. Las membranas celulares son el blanco principal de este gas, produciéndose peroxidación de ácidos grasos insaturados y generando la producción de radicales libres ($\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , etc.). Además, parece que el ozono también oxida moléculas de sustancias estructurales tales como: tioles, aminas, aldehídos, grupos de alcoholes y proteínas. La oxidación de proteínas puede incluir enzimas celulares como glutatión, glutatiónperoxidasa, superóxido dismutasa, catalasa y endopeptidasa neutra (NEP) (16). La cisteína, metionina y el triptófano son los aminoácidos más afectados por el ozono. El ozono también inactiva algunas antiproteasas (24).

Se ha demostrado que un aumento en la concentración atmosférica de O_3 por arriba del límite permisible (0.11 ppm) es capaz de producir alteraciones funcionales en las vías respiratorias tanto del ser humano como de los animales (34). Varios autores han demostrado que la inhalación de 0.2 a 0.75 ppm de O_3 en humanos (29,34,55) y de 1 a 3 ppm en cobayos, ratas y perros (56,59,62,63,65) provocan hiperreactividad de las vías aéreas. Esta hiperreactividad consiste en un aumento de la respuesta de contracción del músculo liso traqueobronquial ante estímulos que en condiciones normales no producirían ninguna respuesta (33,37). Existen varias teorías que tratan de explicar este fenómeno, como daño epitelial de las vías aéreas (12), liberación de los mediadores químicos de la célula cebada (78), la generación de un proceso inflamatorio (23), la estimulación del reflejo vagal (17), la estimulación del sistema contráctil no adrenérgico no colinérgico (NANC) (47), y el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (57).

INFLAMACION DE LAS VIAS AEREAS

Holtzman y col. (36) fueron los primeros en señalar la importancia de la inflamación aguda en la hiperreactividad producida por ozono en las vías aéreas del perro. Estos investigadores demostraron que en todas las biopsias de la pared bronquial de perros que presentaron hiperreactividad a la inhalación de acetilcolina, tras la exposición a ozono, estaban infiltradas con leucocitos polimorfonucleares. Actualmente se postula que la inflamación neutrofílica de las vías aéreas inducida por ozono es uno de los principales mecanismos activados por este gas para producir hiperreactividad.

Murlas (62) encontró que la hiperreactividad de las vías aéreas de cobayos expuestos a 3 ppm de ozono durante 2 horas, estaba asociada a una disminución marcada de las células caliciformes de la mucosa y un aumento de las células cebadas. Se ha propuesto que la inflamación provocada por el ozono trae como consecuencia un aumento en la liberación de mediadores químicos proinflamatorios de las células cebadas como histamina, prostaglandinas, tromboxanos, factor activador de plaquetas (FAP), leucotrienos y factores quimotácticos (23,42,56,62,65). Este incremento de los mediadores químicos, específicamente del tromboxano A_2 , parece ser el responsable de exacerbar la liberación de acetilcolina de las terminales nerviosas (efecto presináptico) (38). En este sentido, Janssen y Daniel (38) encontraron que los efectos presinápticos se manifiestan con mayor intensidad que los postsinápticos después de la exposición a 3 ppm de O_3 durante 1 h. Además, se sabe que el FAP y los leucotrienos están involucrados en el aumento de los efectos postsinápticos a nivel del receptor membranal (18).

INERVACION DEL MUSCULO LISO DE LAS VIAS AEREAS DEL COBAYO

El músculo liso de las vías aéreas del cobayo presenta diferencias regionales en su inervación. Así, el músculo liso traqueal del cobayo está inervado por el sistema nervioso parasimpático (acetilcolina como mediador químico), el simpático (noradrenalina) y el

sistema de relajación no adrenérgico no colinérgico (Vasoactive Intestinal Peptide, VIP y Oxido Nítrico, NO) (3,14,58). El músculo liso bronquial está innervado por el sistema nervioso parasimpático y el sistema de contracción no adrenérgico no colinérgico (Substancia P, SP y Neurocinina A, NKA) (3,46,49,59). Estas diferencias en la innervación de las vías aéreas características de este animal lo hacen un modelo excelente para estudiar la fisiología del sistema nervioso autónomo del pulmón.

Sistema Nervioso Parasimpático

El sistema nervioso parasimpático es el principal mecanismo de control de la contracción de las vías aéreas en todos los animales, incluso el humano. Los nervios colinérgicos eferentes (fibras preganglionares) surgen del núcleo vagal del tallo cerebral y siguen por el nervio vago para hacer sinapsis con los ganglios de las paredes de las vías aéreas. De estos ganglios surgen fibras postganglionares relativamente cortas que se dirigen a las células blanco tales como músculo liso y glándulas. La densidad de la innervación colinérgica disminuye en las vías aéreas más pequeñas, así que existen pocas fibras colinérgicas en los bronquiolos y no hay ninguna en los alveolos. La estimulación colinérgica eferente causa la liberación de acetilcolina (ACh) de las vesículas agranulares en las terminaciones nerviosas colinérgicas y a su vez, este neurotransmisor se difunde rápidamente por el espacio sináptico hasta los receptores colinérgicos de la célula blanco. Asimismo, la ACh es biotransformada rápidamente por la colinesterasa que se concentra en este mismo espacio sináptico. El uso de un inhibidor de la colinesterasa causa broncoconstricción en sujetos normales, sugiriendo que la ACh mantiene el tono basal de las vías aéreas sanas (66). Los ganglios parasimpáticos se sitúan dentro de la pared de las vías aéreas, externos al músculo liso y al cartilago, y a veces, debajo del epitelio. Estos ganglios parasimpáticos pueden contener a veces, además de los nervios colinérgicos y los cuerpos neuronales, perfiles nerviosos adrenérgicos. Algunas células ganglionares presentan vesículas oscuras y se cree que contienen catecolaminas o neuropéptidos. La neurotransmisión colinérgica está modulada por receptores adrenérgicos ganglionares presinápticos α y β (7).

La ACh liberada por los nervios postganglionares activa receptores muscarínicos sobre la

célula blanco en las vías aéreas. Estos receptores son bloqueados por la atropina y fármacos relacionados. La activación de los receptores muscarínicos en el músculo liso de vías aéreas causa contracción. También pueden encontrarse receptores muscarínicos en glándulas submucosas (mucosas y serosas) y en el epitelio de vías aéreas. (13) Recientemente, con el desarrollo de antagonistas selectivos como la pirenzipina, se han caracterizado subtipos de receptores muscarínicos. En la tráquea del cobayo, los receptores presinápticos en la terminales nerviosas colinérgicas que inhiben la liberación de Ach, son quizá del tipo M_1 , mientras que los receptores en el músculo liso tal vez sean M_2 y M_3 . (28,85)

Sistema Nervioso Simpático

La inervación simpática se origina en el segmento cervical y torácico de la médula espinal. Las fibras preganglionares que salen de estos nervios raquídeos hacen sinapsis en los ganglios cercanos a la columna vertebral. Las fibras postganglionares van desde estos ganglios hasta el pulmón, mezclándose con las fibras colinérgicas para formar densos plexos alrededor de las vías aéreas y la vasculatura. En contraste con la extensa inervación parasimpática de las vías aéreas de todas las especies, la inervación simpática es generalmente escasa. (69) Las fibras nerviosas simpáticas inervan glándulas submucosas, arterias bronquiales y al músculo liso traqueobronquial, aunque en poca cantidad en éste último. (64) Los receptores adrenérgicos se han caracterizado como α y β , que a su vez se dividen en α_1 y α_2 , β_1 y β_2 . Los α_1 y β_1 son estimulados por la noradrenalina proveniente de los nervios simpáticos, mientras que los receptores α_2 y β_2 tal vez sean estimulados por adrenalina circulante (de las glándulas adrenales o suprarrenales) (5). El músculo liso de vías aéreas se relaja por la estimulación de receptores β_2 . Estudios funcionales *in vitro* usando estimulación eléctrica de campo, han demostrado una relajación mediada neuronalmente en la tráquea de cobayo, la cual puede bloquearse usando antagonistas adrenérgicos- β ; sin embargo, este efecto no se observó en las preparaciones bronquiales. Así se confirma la existencia de inervación adrenérgica en la tráquea de esta especie y su ausencia en los bronquios (32).

La estimulación de los receptores adrenérgicos- α contraen el músculo liso de las vías aéreas,

aunque esta respuesta se presenta sólo bajo ciertas condiciones y depende de la especie utilizada; *in vitro*, fue necesario emplear serotonina o histamina en los tejidos antes de obtener una respuesta de contracción del músculo liso de vías aéreas con la adición de un agonista α -adrenérgico (11). Aunque normalmente la estimulación de los receptores adrenérgicos α no produce contracción del músculo liso de las vías aéreas, ésta aparece en condiciones clínicas como bronquitis crónica y bronconeumonía (41). Sin embargo, en un estudio realizado en músculo liso traqueal de mono *Erythrocebus patas*, se observó que la estimulación de este tejido con adrenalina producía una contracción del tejido en lugar de la relajación habitual observada en la mayoría de las preparaciones traqueales de otras especies, lo cual sugiere que en el músculo liso de este primate predominan los receptores adrenérgicos- α (60). También se piensa que existen receptores adrenérgicos- α presinápticos en los ganglios de vías aéreas y que inhiben la liberación de acetilcolina (7).

Las acciones fisiológicas de las catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) cesan por la recaptación en las terminales nerviosas, por difusión fuera de la hendidura sináptica y por transformación metabólica. Dos enzimas son importantes en los pasos iniciales de la transformación metabólica de las catecolaminas: la monoaminooxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). A diferencia de la Ach, la transformación metabólica tiene una importancia relativamente menor en el cese de las actividades de los neurotransmisores simpáticos comparada con la recaptación de catecolaminas por las terminales nerviosas. (6)

Sistema Nervioso No Adrenérgico No Colinérgico (NANC)

El descubrimiento de un tercer componente de control neuronal en las vías aéreas, que no es ni colinérgico ni adrenérgico, llevó a los científicos a reconocer que la inervación de las vías aéreas es más compleja de lo que se había pensado. El sistema no-adrenérgico no-colinérgico (NANC) ha sido estudiado a fondo en el tracto gastrointestinal y también está presente en el tracto urogenital, en el ojo, el sistema cardiovascular y en el pulmón (40); tiene una porción excitatoria (e-NANC) y una inhibitoria (i-NANC). Los mecanismos NANC en el sistema respiratorio pueden producir broncoconstricción y broncodilatación, vasodilatación y

vasoconstricción y la secreción de moco, indicando que existen diversos tipos de neurotransmisores. Los nervios inhibitorios-NANC (i-NANC) relajan al músculo liso de las vías aéreas. Su existencia ha sido demostrada en las vías aéreas de varias especies, incluso en humanos, en estudios *in vitro* por estimulación eléctrica de campo tras el bloqueo colinérgico y adrenérgico (9,68). Las evidencias actuales sugieren que en la mayoría de las especies el neurotransmisor del sistema i-NANC es el neuropéptido llamado péptido vasoactivo intestinal, mejor conocido por sus siglas en inglés (VIP). La estimulación eléctrica *in vitro* de los bronquios del cobayo y del nervio vago *in vivo*, produce una broncoconstricción que no es inhibida por atropina; esta respuesta corresponde a la estimulación e-NANC. Existen numerosas evidencias de que la sustancia P y las taquicinas, consideradas como los neurotransmisores del sistema e-NANC, son liberadas en forma antidrómica por una población de nervios sensoriales o aferentes llamados fibras-C. (49).

En un principio se pensó que el sistema NANC era un sistema nervioso anatómicamente separado, pero ahora parece más factible que los efectos NANC dependan de la liberación de neurotransmisores de los nervios autónomos clásicos, es decir, es muy factible que haya interacciones funcionales entre los múltiples péptidos liberados por el sistema NANC y los transmisores de la innervación clásica.

Sistema Inhibitorio No Adrenérgico No Colinérgico (i-NANC)

El VIP, considerado por la mayoría de los autores como el neurotransmisor del i-NANC, es un péptido de 28 aminoácidos que fue aislado originalmente del duodeno de porcinos para ser empleado como péptido vasodilatador (73). La localización del VIP en el pulmón ha sido bien descrita utilizando anticuerpos marcados contra este péptido (inmunoreactividad). Se ha encontrado inmunoreactividad (IR) al VIP en células ganglionares de la tráquea posterior y alrededor de los bronquios intrapulmonares, disminuyendo su frecuencia al hacerse más pequeñas las vías aéreas. Por lo general, las neuronas VIP-érgicas se encuentran en ganglios parasimpáticos, pero también se pueden encontrar en células ganglionares aisladas (48). Los nervios VIP-érgicos se hallan dentro del músculo liso de las vías aéreas, alrededor de los vasos

sanguíneos bronquiales y rodeando glándulas submucosas. También puede hallarse VIP en los nervios sensoriales y adrenérgicos.

Las acciones VIP son similares a las de los agonistas adrenérgicos- β ; es un potente relajante del músculo liso *in vitro* y ésta relajación es independiente de los receptores adrenérgicos- β (72). Es más efectivo que el isoproterenol, siendo uno de los broncodilatadores endógenos más potentes. Además, el VIP coexiste con la acetilcolina en algunos nervios colinérgicos y tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de este neurotransmisor (1,20,52).

Quizá los estudios con enzimas que biotransforman este péptido sean la prueba fehaciente de que el VIP es el transmisor i-NANC. El VIP es biodegradado rápidamente por la tripsina y la α -quimotripsina de las células cebadas. La incubación de la tráquea de cobayo con α -quimotripsina resulta en una reducción significativa de la respuesta i-NANC (26), aumentando la contracción inducida por la estimulación colinérgica en las vías aéreas de los cobayos (21). Sin embargo, la inhibición de la relajación es incompleta indicando que tal vez algún otro transmisor esté involucrado.

Se cree que el óxido nítrico (NO) es el otro mediador del sistema i-NANC (44,81). Algunas de las actividades biológicas que se le atribuyen al NO son la relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos y de las vías aéreas. Diversos estudios en pulmones de gatos y humanos señalan que el NO tal vez sea el neurotransmisor del i-NANC en estas especies (2, 84). Sin embargo, en el caso de los cobayos, información reciente parece demostrar que esta sustancia no juega ningún papel importante como neurotransmisor i-NANC en las vías aéreas (25).

Se desconoce si el NO es liberado como neurotransmisor o es un mediador controlado por un neurotransmisor clásico. Si el NO es secretado como neurotransmisor, aún no se han descubierto los nervios que lo liberan; no se sabe si el NO se localiza en los nervios colinérgicos de las vías aéreas y, por ello, tal vez exista una población de nervios i-NANC aun no caracterizada.

El péptido histidina-isoleucina (PII) y el equivalente humano péptido histidina-metionina (PIIM) son muy similares al VIP en estructura y ambos péptidos se sintetizan a partir de la misma prohormona, con 50% de homología en la secuencia de aminoácidos (28).

El PHI tiene la misma distribución inmunocitoquímica que el VIP en el pulmón, en nervios que inervan el músculo liso de vías aéreas, vasos bronquiales y pulmonares, glándulas submucosas y ganglios de vías aéreas. En los bronquios humanos PHM es un relajante potente y se equipara con el VIP (86). Es factible que el PHI y el PHM se secreten con el VIP en los nervios de las vías aéreas. (80) (Cuadro 4).

Sistema Excitatorio No Adrenérgico No Colinérgico (e-NANC)

Se considera que la Sustancia P, un péptido de 11 aminoácidos, es el neurotransmisor principal del e-NANC. La sustancia P (SP) fue descubierta en 1939 por Van Euler y Gaddum en extractos de cerebro e intestino de equinos. Estos extractos contenían un factor espasmogénico e hipotensor cuya acción no era afectada por la atropina. Van Euler y Gaddum prepararon un polvo seco para hacer varios experimentos y se refirieron a él como P, abreviación de polvo; así se desarrolló el término sustancia P (40).

Hoy en día se han caracterizado varios péptidos relacionados a la SP llamados taquicinas. Se conocen la taquicina A (NKA), la taquicina B (NKB) y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) (22).

La SP se localiza en los nervios de diversas especies, incluyendo el humano. Se ha encontrado inmunoreactividad a SP (IR-SP) debajo y dentro del epitelio, alrededor de los vasos sanguíneos y en menor número, dentro del músculo liso (4). Algunas fibras IR-SP inervan a los ganglios parasimpáticos, sugiriendo que existe retroalimentación sensorial que modula la transmisión ganglionar y resulta en reflejos ganglionares. Parece que, en las vías aéreas, la SP se localiza principalmente en terminales nerviosas no mielinizadas llamadas fibras-C. Estas terminales no mielinizadas son estimuladas por capsaicina (el extracto picante de los chiles: *Capsicum annum*) (3,10,45) lo que las caracteriza farmacológicamente. La estimulación de las fibras-C con capsaicina en perros causa una broncoconstricción refleja e hiperpnea que tal vez estén mediadas por la depleción de SP de las terminaciones nerviosas tipo-C. La inhalación de capsaicina por humanos produce una tos intensa y una broncoconstricción pasajera que son causadas, tal vez, por la estimulación de fibras-C y la

liberación de SP.

La SP es sintetizada sobre todo en el ganglio nodoso del nervio vago y luego es transportada a lo largo del vago a las ramas periféricas aferentes pulmonares. Algunos nervios IR-SP nacen de los ganglios dorsales, pero no se sabe si estos nervios tienen una distribución y una función similares a las del ganglio nodoso (54). Los nervios IR-NKA parecen tener la misma localización que los que contienen SP.

Los efectos de las taquicinas sobre la célula blanco están mediados por receptores específicos; cada taquicina parece activar a un receptor distinto:

Receptores NK₁-Activados preferentemente por SP

Receptores NK₂-Activados preferentemente por NKA

Receptores NK₃-Activados preferentemente por NKB (67).

Los receptores para SP se hallan en gran cantidad en el músculo liso de la tráquea disminuyendo sensiblemente hasta los bronquiolos y en el endotelio vascular. (8) En el músculo liso bronquial del cobayo, los receptores NK₂ parecen estar en mayor cantidad que los NK₁, sugiriendo que la contracción bronquial α -NANC tal vez esté mediada por NKA en esta especie (51). Por ello, aunque la SP y la NKA se localizan en los mismos nervios y se crea que se secretan juntos, sus acciones deben ser diferentes debido a la distribución de los receptores.

Las taquicinas son biotransformadas por al menos dos enzimas: la enzima convertidora de la angiotensina (Angiotensin Converting Enzyme; ACE) y la endopeptidasa neutra (Neutral Endopeptidase; NEP). La ACE se localiza en las células endoteliales vasculares y desnaturaliza péptidos intravasculares. Biotransforma a la SP, pero la NKA no es buen sustrato (53,79). La NEP parece ser más importante en la degradación de SP y taquicinas.

La respuesta de contracción a NKA es significativamente mayor en bronquios humanos pequeños, indicando que las taquicinas probablemente tengan un efecto constrictor más potente en las vías aéreas periféricas, mientras que la constricción colinérgica tiende a ser mayor en las vías aéreas superiores (27).

La remoción mecánica del epitelio de las vías aéreas potencia el efecto broncoconstrictor de las taquicinas. Para la NKA y la SP, el efecto de la remoción del epitelio puede ser equivalente

a la inhibición de la NEP con fosforamidón, sustancia que inactiva a la NEP (70). Dado que la NEP se localiza en el epitelio, la remoción mecánica tal vez elimine el sitio de mayor catabolismo de taquicinas.

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Calcitonin Gen Related Peptide, CGRP) es un neuropéptido de 37, aminoácidos recientemente descubierto, y que se deriva del mismo gen que la calcitonina (71). En el sistema nervioso periférico, el CGRP está presente en las neuronas sensoriales y fibras nerviosas de la SP; sus acciones biológicas incluyen contracción del músculo liso y vasodilatación (30,43). La IR-CGRP desaparecen tras el tratamiento con capsaicina. Por eso, se postuló que la SP y el CGRP coexisten en las mismas fibras-C (50). (Cuadro 5)

HIPOTESIS

La exposición de ozono, a concentraciones cercanas al máximo permitido en la Ciudad de México, produce respuestas presinápticas en el músculo liso de las vías aéreas. Son necesarias concentraciones mayores de este gas para observar las respuestas a nivel postsináptico en el mismo tejido.

OBJETIVO

El propósito del presente trabajo fue evaluar si después de la exposición aguda a ozono, los efectos de este oxidante se manifestaban principalmente a nivel presináptico a concentraciones a las que los efectos postsinápticos no eran perceptibles.

MATERIAL Y METODOS

Cobayos Hartley, machos, criados en condiciones libres de ozono y con peso entre 400 y 500 g, se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 6 cada uno. Los cobayos fueron sometidos durante 4 horas a una exposición única de ozono a concentraciones de 0.3 ppm, 0.6 ppm y 1.2 ppm, respectivamente. Como grupo control se emplearon 6 animales criados en condiciones libres de O₃. Todos los animales se estudiaron 16 a 18 horas después de la

exposición a ozono, período en que se presenta la hiperreactividad (16).

Exposición a Ozono

El O₃ se produjo con un generador de ozono (Puraqua V) y se condujo a una cámara de acrílico (10.5 cm de diámetro x 15 cm de alto) donde previamente se colocó a los cobayos despiertos, tranquilos y respirando espontáneamente. La concentración de ozono se vigiló con un analizador ultravioleta de ozono (Modelo 1008 AH, Dasibi Environmental Corp., Glendale, CA, EUA.) y las concentraciones (0.3, 0.6, 1.2 ppm) se regularon aumentando o disminuyendo el voltaje del generador de ozono.

Tejidos Aislados

Los cobayos se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital sódico. Habiendo disecado cuidadosamente el tracto respiratorio, se obtuvieron 4 anillos traqueales y dos anillos bronquiales. Cada anillo se colgó entre dos ganchos paralelos de platino. Un gancho se anudó con hilo quirúrgico de seda de 4 ceros al transductor del polígrafo y el otro gancho pertenecía al electrodo. Cada uno de los tejidos fue colocado en una cámara de órganos aislados con 10 ml de Solución de Krebs (mM): NaCl 120, KCl 4.77, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11, siempre conservada a 37°C y burbujeada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y a un pH de 7.4. Los tejidos se mantuvieron a una tensión basal de un gramo. La tensión isométrica fue registrada con un polígrafo Modelo Beckman R612. Los tejidos se lavaron varias veces con Solución de Krebs y tan pronto alcanzaron una basal se iniciaron los experimentos.

Estimulación Eléctrica de Campo

Cada tejido se sometió a varios estímulos eléctricos: 100 volts, 2 ms, durante 10 segundos a 16, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 Hz en orden progresivo. Bajo estos parámetros, la tetrodotoxina (bloqueador de los canales de sodio) bloqueó el 100% de la respuesta, demostrando que ésta

se debía a la liberación de los neurotransmisores por el estímulo eléctrico y no a un efecto directo sobre el músculo liso (58). Con el propósito de evaluar el efecto del ozono sobre el sistema nervioso parasimpático, simpático y NANC de las preparaciones traqueales y bronquiales, se diseñó el siguiente protocolo:

Tráquea 1: Control

Tráquea 2: Con Atropina (Antagonista de los receptores colinérgicos. Basta $2\mu\text{M}$ para bloquear la respuesta colinérgica)

Tráquea 3: Con Propranolol (Antagonista de los receptores β adrenérgicos. Basta $10\mu\text{M}$ para bloquear la respuesta adrenérgica)+ **Atropina** (Antagonista de los receptores colinérgicos. Basta $2\mu\text{M}$ para bloquear la respuesta colinérgica)

Bronquio 1: Control

Bronquio 2: Atropina (Antagonista de los receptores colinérgicos. Basta $2\mu\text{M}$ para bloquear la respuesta colinérgica)

Curva Concentración Respuesta a Carbacol

Al terminar el tren de estimulación eléctrica y una vez que la tráquea y el bronquio (sin fármaco) regresaron a su nivel basal tras varios lavados con solución de Krebs, se realizaron curvas acumulativas concentración-respuesta al carbacol (Cch) 10^{-8} a 10^{-6}M . Las respuestas a Cch se evaluaron como concentración efectiva 50 (CE_{50}) y como respuesta máxima. La CE_{50} representa la concentración de carbacol ($-\text{Log}[\text{Cch}]\text{M}$) con la cual se obtuvo el 50% de la respuesta máxima y refleja la sensibilidad del tejido a este agonista. Para cada experimento se calculó la CE_{50} mediante análisis de regresión lineal empleando los valores logarítmicos de la curva concentración respuesta al Cch y los valores de las respuestas transformados a probits. La respuesta máxima expresa los gramos de tensión obtenidos en el punto más alto de la contracción generada por el Cch.

TEJIDO	AGONISTA	ESTÍMULO ELÉCTRICO	CURVA ACUMULATIVA A CARBACOL
Bronquio	-	Sí	Sí
Bronquio	Atropina (2 μ M)	Sí	No
Tráquea	-	Sí	Sí
Tráquea	Atropina (2 μ M)	Sí	No
Tráquea	Atropina (2 μ M) Propranolol (10 μ M)	Sí	No

Cuadro Sinóptico de Métodos

Diseño Estadístico e Interpretación de Resultados

Se realizó una prueba de Cochran para homogeneidad de varianzas para establecer la influencia de la frecuencia del estímulo eléctrico y la concentración de ozono sobre las respuestas encontradas.

Los resultados de los experimentos con tráqueas fueron expresados como gramos de tensión o relajación desarrollada. Los resultados de los experimentos con bronquios fueron expresados como gramos de tensión desarrollada y en algunos casos como área bajo la curva que se calculó utilizando un planímetro (Plautx 2-S, Tamaya). Se calculó un índice (diferencia aritmética) entre la última respuesta e-NANC y la primera a estímulos eléctricos iguales (16 Hz). Este índice se calculó para diversos periodos: 0-1, 1-3, 3-5, 5-10 y 10-15 minutos.

Para el análisis estadístico de estos resultados se usó análisis de varianza (ANOVA) (83). En los casos en que el ANOVA resultó significativo a un nivel de $P < 0.05$ se efectuaron pruebas de Dunnett (19). En algunos casos se utilizó la prueba T de student para datos pareados. El nivel de significancia fue de $P < 0.05$ bimarginal. Los resultados fueron expresados como $\bar{X} \pm \text{ESM}$.

RESULTADOS

Respuestas Traqueales a la Estimulación Eléctrica de Campo

La estimulación eléctrica de las preparaciones traqueales produjo una respuesta bifásica la cual fue dependiente de la frecuencia de estimulación. Primero se observó la contracción, que es colinérgica, y después la relajación, que es adrenérgica y del i-NANC (Fig. 4). La incubación previa de los anillos traqueales con atropina bloqueó la contracción colinérgica y sólo se observó relajación del músculo liso traqueal. La adición de atropina y propranolol produjo sólo una respuesta de relajación que corresponde a la estimulación del sistema i-NANC (Fig. 5).

En las respuestas de contracción inducidas por la estimulación eléctrica no hubo ninguna diferencia significativa entre el control y las tráqueas sujetas a las diversas concentraciones de ozono (Fig. 6).

En las respuestas de relajación de las tráqueas, las diferencias entre el control y los diferentes tratamientos fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) a frecuencias bajas: 0.5 Hz y 1 Hz. En el caso de 0.5 Hz, las diferencias entre el control y los tratamientos: 0.3, 0.6 y 1.2 ppm de O_3 fueron todas significativas ($P < 0.05$). Para 1 Hz, las diferencias se encontraron entre el control y los tratamientos de 0.6 y 1.2 ppm de O_3 (Fig 6).

En las tráqueas incubadas con atropina (2 μM), y propranolol (1 μM) no se encontró ninguna diferencia significativa. (Fig. 7)

Respuesta Traqueal al Carbacol

La administración de carbacol al tejido traqueal produjo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada. (Fig. 8)

La curva concentración-respuesta al carbacol se desplazó hacia la izquierda en las preparaciones previamente expuestas a las diferentes concentraciones de ozono mostrando un aumento en la sensibilidad del tejido a este agonista. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la CE_{50} pero sí ($P < 0.05$) en la respuesta máxima entre el control

y el tratamiento de 1.2 ppm de O_3 (Fig. 9).

Respuestas Bronquiales a la Estimulación Eléctrica de Campo

La estimulación eléctrica de campo de las preparaciones bronquiales produjo una respuesta de contracción la cual fue dependiente de la frecuencia de la estimulación. Esta respuesta presentó dos fases: una respuesta rápida que es colinérgica y una respuesta lenta que corresponde al sistema e-NANC (Fig 10). La administración de atropina bloqueó totalmente la fase inicial colinérgica manifestándose únicamente la contracción e-NANC (Fig. 11). La exposición a ozono con las diferentes concentraciones no modificó la mayoría de las respuestas puntuales de contracción máxima colinérgica, sólo se observó una disminución significativa en la respuesta de contracción inducida por 0.25 y 0.5 Hz con el tratamiento de 1.2 ppm de O_3 (Fig. 12). Cabe mencionar que se observó efecto significativo de la interacción entre el nivel de O_3 y la frecuencia de estimulación ($P < 0.0001$).

La exposición a O_3 no modificó la respuesta puntual máxima del sistema e-NANC en las preparaciones bronquiales (Fig. 13). Sin embargo, se observó que después de la exposición a ozono la segunda respuesta de contracción e-NANC a 16 Hz era mucho más prolongada que la primera respuesta a la misma frecuencia en las preparaciones bronquiales de los tratamientos de 0.6 y 1.2 ppm de O_3 . Por esta razón se decidió analizar la relación entre el estímulo final de 16 Hz y el inicial con la misma frecuencia (EF/EI). Esta relación se utilizó para estudiar tanto la respuesta mediada por el sistema parasimpático y el e-NANC y el e-NANC solo, es decir, en presencia de atropina. Para poder estudiar este fenómeno se utilizó el área bajo la curva a diferentes intervalos (0-1, 1-3, 3-5, 5-10 y 10-15 minutos) y se expresó la respuesta como el índice EF/EI, es decir, la diferencia entre la respuesta de contracción final inducida por 16 Hz y la respuesta inicial producida por el mismo estímulo de 16 Hz.

La exposición a 0.6 ppm de O_3 produjo un incremento significativo ($P < 0.05$) en el índice EF/EI en el período de 10-15 minutos, de las preparaciones bronquiales sin atropina, (Fig. 14) y en las preparaciones incubadas con atropina, la significancia ($P < 0.05$) se halló en el período de 5-10 minutos (Fig. 15).

Respuestas Bronquiales al Carbacol

La administración de carbacol a las preparaciones bronquiales produjo una respuesta de contracción la cual fue dependiente de la concentración del fármaco. (Fig. 9).

La curva concentración-respuesta al carbacol se desplazó hacia la izquierda en las preparaciones previamente expuestas a las diferentes concentraciones de ozono, mostrando un aumento en la sensibilidad del tejido a este agonista. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la CE_{50} , pero sí ($P < 0.05$) en la respuesta máxima entre el control y los tratamientos de 0.6 y 1.2 ppm de O_3 (Fig. 16).

DISCUSIÓN

Está bien establecido que la exposición aguda a ozono, con concentraciones mayores de 1ppm, produce hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina y a la acetilcolina (16,18,23,36,76). La mayoría de estos trabajos se han realizado en condiciones *in vivo* por lo que sólo se han estudiado los efectos postsinápticos. Sin embargo, existe un solo trabajo en la literatura donde se estudian los efectos presinápticos inducidos por el ozono. Este estudio se realizó en músculo liso bronquial de perro y sólo se pudo explorar el efecto inducido por la exposición a concentraciones muy altas (3 ppm) de ozono sobre la liberación de acetilcolina a la estimulación eléctrica. (37)

El presente trabajo, realizado en cobayos, expone los resultados de una investigación sobre los efectos presinápticos inducidos por el ozono sobre los sistema parasimpático, simpático y el sistema NANC en sus dos modalidades, excitatoria y de relajación, así como los efectos postsinápticos a concentraciones que con mucha frecuencia se alcanzan en la Ciudad de México.

Experimentos con triqueas

Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo fue el hecho de que la exposición a ozono, a concentraciones tan bajas como 0.3 ppm, produjo una reducción o anulación de la

relajación inducida por la estimulación eléctrica de las preparaciones traqueales de los animales expuestos a este oxidante, con respecto a los tejidos provenientes de los animales control, sobre todo a frecuencias de estimulación bajas. Hasta donde se sabe estos resultados son la primera evidencia que demuestra este hecho.

Es bien conocido que la relajación del músculo liso traqueal inducida por la estimulación eléctrica está mediada por el sistema simpático y por el i-NANC a través de la liberación de noradrenalina y VIP respectivamente. Se sabe muy bien que en el asma existe un proceso inflamatorio con un aumento en la cantidad de células cebadas, neutrófilos y eosinófilos. Estos últimos, al ser activados, liberan proteasas y peptidasas, mientras que las células cebadas generan enzimas como tripsina y quimasa. Todas estas enzimas son responsables de biotransformar al neurotransmisor del i-NANC, produciendo en consecuencia la inactivación de uno de los sistemas de relajación más importantes que tiene el ser humano (20). Es muy probable que este fenómeno también esté ocurriendo con los animales expuestos a ozono, ya que está bien demostrado que este oxidante induce un proceso inflamatorio agudo con predominio de neutrófilos (36). Por lo tanto un aumento de células inflamatorias, y en consecuencia un aumento en la cantidad de proteasas/peptidasas en el medio, podría explicar la reducción de la relajación inducida por la estimulación eléctrica de las tráqueas. Este fenómeno explicaría a su vez, parcialmente, la hiperreactividad traqueal al carbacol inducida por el ozono, ya que al haber una disminución en los sistemas de relajación, la acción de las sustancias broncoconstrictoras se podría manifestar con mayor intensidad (Fig. 8).

Sin embargo, es interesante mencionar que esta disminución en la relajación inducida por el ozono no se observó cuando las preparaciones traqueales fueron incubadas con atropina y propranolol demostrando que, probablemente, para que este fenómeno se observe es necesaria la modulación tanto colinérgica como simpática. En este sentido, existen algunos trabajos donde se postula que las catecolaminas afectan la liberación de acetilcolina en el músculo liso traqueal (57) por lo que podríamos especular que la acción de la acetilcolina y noradrenalina es necesaria para modular la liberación de VIP y que, bloqueado el efecto de estos neurotransmisores, no se puede observar el efecto inhibitorio inducido por el ozono.

Por otro lado, encontramos que la exposición a ozono sólo produjo un aumento en la sensibilidad del músculo liso traqueal al carbacol a concentraciones mayores de 1.2 ppm. Por lo tanto podríamos concluir que los efectos de este oxidante a bajas concentraciones se manifiestan principalmente a nivel presináptico, mientras que a esas mismas concentraciones los efectos postsinápticos no son perceptibles.

Experimentos con bronquios

Las respuestas bronquiales puntuales a la estimulación eléctrica, tanto en su fase colinérgica como en la fase e-NANC, no se modificaron por la exposición a las diferentes concentraciones de ozono, con excepción de la fase colinérgica de las respuestas inducidas por 0.25 y 0.5 Hz las cuales disminuyeron significativamente en cobayos expuestos a 1.2 ppm de O₃. Este resultado sugiere que la acción del ozono no es independiente de la frecuencia de estimulación, ya que con frecuencias superiores a 0.5 Hz, el nivel promedio de tensión tiende a incrementarse proporcionalmente a ésta. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, se decidió estudiar si la relación EF/EI a 16 Hz variaba por la exposición de los animales a ozono, así como determinar la participación de los sistemas parasimpático y e-NANC en dicha respuesta. El hallazgo de que a 0.6 ppm de O₃ el índice EF/EI aumentó significativamente en el lapso de 10 a 15 minutos, y de que este aumento se observó en el lapso de 5-10 minutos cuando las preparaciones bronquiales fueron pretratadas con atropina, parece indicar que, en esta prolongación de la respuesta a 16 Hz, el componente del sistema e-NANC es el que realmente se modificó por efecto de la exposición a ozono.

Considerando que el mediador principal de la contracción por la intervención e-NANC es la Sustancia P, una acción aumentada de ésta prolongaría la respuesta al estímulo eléctrico de 16 Hz, y su disponibilidad en el tejido puede depender de la inactivación de neuropeptidasas por efecto del ozono. En efecto, Murlas y col. han reportado que el ozono causa hiperreactividad a Sustancia P e hipoactividad de la endopeptidasa neutra (18,42,61)

En relación con los efectos postsinápticos del ozono en la preparación bronquial, cabe señalar que se observó un comportamiento similar al de las tráqueas. Es decir, existe un desplazamiento

de las curvas hacia la izquierda cuando los animales fueron expuestos a ozono, pero este desplazamiento no fue significativo al comparar las CE_{50} . Sin embargo, la respuesta máxima a carbacol sí mostró un aumento significativo en cobayos expuestos a 0.6 y 1.2 ppm de ozono. Este hecho es indicativo de que la respuesta postsináptica de las vías aéreas expuestas a ozono se observa tras la exposición a concentraciones altas de este gas.

En términos de efectos presinápticos y postsinápticos, las observaciones señalan que en los bronquios ambos efectos se presentaron desde 0.6 ppm de ozono indistintamente, ya fuera estudiado el sistema e-NANC presináptico o el efecto colinérgico postsináptico.

Asimismo, este estudio se diseñó con la intención de desglosar los diferentes componentes pre- y postsinápticos en dos preparaciones en las que están bien documentadas sus diferencias en cuanto a inervación. Los resultados encontrados, analizando los diferentes componentes de ambas respuestas tanto en tráquea como en bronquio nos permiten afirmar que sí hay efectos inducidos por ozono desde concentraciones tan pequeñas como 0.3 ppm en tráquea y 0.6 ppm en bronquio; hallazgo novedoso, pues los trabajos anteriores señalan que la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por ozono sólo se presenta a concentraciones altas (31,35,39,77).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aizawa, H., Ionue, H., Shigyo, M., Takata, S., Koto, H., Matsumoto, K. and Hara, N.: VIP antagonists enhance excitatory cholinergic neurotransmission in the human airway. Lung **172**:159-167, (1994).
- 2.- Altieri, R.J., Diamond, L. and Thompson, D.C.: Species variation in airway sensitivity to nitric oxide and nonadrenergic noncholinergic inhibitory nerve activation. In: The American Thoracic Society, Abstracts on Disk, 1994 International Conference. (A594).
- 3.- Andersson, R.G.G. and Grundstrom, N.: Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. Pharmacol. Ther. **32**:107-129, (1987).
- 4.- Andersson, R. G.G. and Grundström, N.: The excitatory non-cholinergic, non-adrenergic nervous system of the guinea-pig airways. Acta Pharmacol. Toxicol. **41**:444-448, (1983).
- 5.- Ariëns, E.J. and Simonis, A.M.: Physiological and pharmacological aspects of adrenergic receptors classification. Biochem. Pharmacol. **81**:611-615, (1984).
- 6.- Axelrod, J.: The fate of noradrenaline in the sympathetic neurone. Harvey Lect. **67**:175-197, (1973).
- 7.- Baker, D.G., Basbaum, C.B., Herbert, D.A. and Mitchell, R.A.: Transmission in airway ganglia of ferrets: inhibition by norepinephrine. Neurosci. Lett. **41**:139-143, (1983).
- 8.- Baraniuk, J.N., Lundgren, J.D., Mullol, J., Okayama, M., Merida, M. and Kaliner, M.: Substance P and neurokinin A in human nasal mucosa. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **4**:228-236, (1985).
- 9.- Barnes, P.J.: Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of human airways. Arch. Intern. Pharmacodyn. **280**:208-228, (1986).
- 10.- Barnes, P.J., Baraniuk, J.N. and Belvisi, M.G.: Neuropeptides in the respiratory tract. Am. Rev. Respir. Dis. **144**:1187-1198, (1991).
- 11.- Barnes, P.J., Skoogh, B.E., Brown, J.K. and Nadel, J.A.: Activation of alpha-adrenergic responses in tracheal smooth muscle: a post-receptor mechanism. J. Appl. Physiol. **54**:1469-1476, (1983).
- 12.- Barnes, P.J., Cuss, F.M. and Palmer, J.M.: The effect of airway epithelium on smooth muscle contractibility in bovine trachea. Br. J. Pharmacol. **86**:685-691, (1985).

- 13.- Basbaum, C.B., Ueki, I.F., Berzina, L. and Nadel, J.A.: Tracheal submucosal gland serous cells stimulated in vitro with adrenergic and cholinergic agonists. Cell Tissue Res. 220:481-498, (1981).
- 14.- Blackman, J.G. and McCaig, D.J.: Studies on isolated innervated preparation of guinea-pig trachea. Br.J.Pharmac. 80:703-710, (1983).
- 15.- Bravo, H., Soza, R. y Torres, R.: Ozono y lluvia ácida en la ciudad de México. Ciencias 22:33-40, (1991).
- 16.- Campos, M.G., Segura, P., Vargas, M.H., Vanda, B., Ponce-Monter, H., Selman, M. and Montaña, L.M.: O₃-induced hyperresponsiveness to noncholinergic system and other stimuli. J.Appl.Physiol. 73:354-361, (1992).
- 17.- Castelman, W.L., Dungworth, D.L., Schwartz, L.W. and Tyler, W.S.: Acute respiratory bronchitis. Am. J. Pathol. 98:811-840, (1980).
- 18.- Daniel, E.E. and O'Byrne, P.: Autonomic nerves and airway smooth muscle. Effect of inflammatory mediators on airway nerves and muscle. Am.Rev.Respir.Dis. 143:S3-S5, (1991)..
- 19.- Dunnett, C.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Am. Stat. Ass. Jour. Dec.:1096-1121 (1955).
- 20.- Ellis, J.L. and Farmer, S.G.: Effects of peptidases on non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory responses of tracheal smooth muscle: a comparison with effects on VIP-and PHI-induced relaxation. Br.J.Pharmacol. 96:521-526, (1989).
- 21.- Ellis, J.L. and Farmer, S.G.: Modulation of cholinergic neurotransmission by vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine in guinea pig tracheal smooth muscle. Pulm.Pharmacol. 2:107-112, (1989).
- 22.- Erspaner, V.: The tachykinin peptide family. Trends Neurosci. 4:267-269, (1981).
- 23.- Fabbri, L.M., Aizawa, H., Alpert, S.E., Walters, E.H., O'Byrne, P.M., Gold, B.D., Nadel, J.A. and Holtzman, M.J.: Airway hyperresponsiveness and changes in cell counts in bronchoalveolar lavage after ozone exposure in dogs. Am. Rev. Respir. Dis. 129:288-291, (1984).
- 24.- Favez, G.: The impact of the atmospheric pollution on the lungs. Schweiz Med. Wschr. 116 (25): 830-837, (1986).

- 25.- Fedan, J.S. and Yuan, L.X.: Oxide synthase inhibitors do not potentiate contractions of guinea-pig isolated, perfused trachea to metacholine and histamine: examination of different perfusion (shear) rates. In: The American Thoracic Society, Abstracts on Disk, International Conference. (A593), (1994).
- 26.- Franconi, G.M., Graf, P.D., Lazarus, S.C., Nadel, J.A. and Caughey, G.H.: Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret. Jour.Pharm.and Exper. Therap. 248:947-951, (1989).
- 27.- Frossard, N. and Barnes, P.J.: Effects of tachykinins on small human airways. Neuropeptides 19:157-162, (1991).
- 28.- Fryer, A.D. and MacLagan, J.: Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathic nerves in the guinea-pig. Br.J.Pharmacol. 83:973-978, (1984).
- 29.- Golden, J.A., Nadel, J.A. and Boushey, H.A.: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. Am.Rev.Respir.Dis. 118:287-294, (1978).
- 30.- Goodman, E.C. and Iversen, L.L.: Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide. Life Sci. 38:2169-2178, (1986).
- 31.- Gordon, T., Venugopalan, C.S., Amdur, M.O. and Drazen, J.M.: Ozone-induced airway hyperreactivity in the guinea pig. J.Appl.Physiol. 57(4):1034-1038, (1984).
- 32.- Grundstrom, N., Andersson, R.G.G. and Wikberg, J.E.S.: Pharmacological characterization of the autonomous innervation of guinea pig tracheobronchial smooth muscle. Acta Pharmacol. Physiol. 5:325-332, (1978).
- 33.- Hargreave, F.E., Ryan, G., Thomson, N.C., O'Byrne, P.M., Latimer, K., Juniper, E.F. and Dolovich, H.: Bronchial Responsiveness to histamine or metacholine in asthma: measurement and clinical significance. J.Allergy Clin. Immunol. 68:347-355, (1981).
- 34.- Hazucha, M.J.: Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. J.Appl.Physiol. 259:L304-L313, (1990).
- 35.- Holroyde, M.C. and Norris, A.A.: The effect of ozone on reactivity of upper and lower airways in guinea pigs. Br.J.Pharmacol. 94:938-946, (1988).
- 36.- Holtzman, M.J., Fabbri, L.M., O'Byrne, P.M., Aizawa, G., Walters, E.H. Albert, S.E. and Nadel, J.A.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone in dogs. Am.Rev.Respir.Dis. 127:686-690, (1983).

- 37.- Janssen, L.J., O'Byrne, P.M. and Daniel, E.E.: Mechanisms underlying ozone-induced in vitro hyperresponsiveness in canine bronchi. *Am. J. Physiol.* **261**:155-162 (1991).
- 38.- Janssen, L.J. and Daniel, E.E.: Pre- and postjunctional muscarinic receptors in canine bronchi. *Am. J. Physiol.* **259**:L304-L314, (1990).
- 39.- Jones, G.L., Lane, C.G., Manning, P.J. and O'Byrne, P.M.: Role of the parasympathetic nervous system in airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *J. Appl. Physiol.* **63** (3):1174-1179, (1987).
- 40.- Joose, G.F.P., Pauwels, R.A.R. and Van Der Straeten, M.E.R.P.: The role of neuropeptides as neurotransmitters of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in bronchial asthma. *Bull. Eur. Physiopath. Respir.* **23**:619-637, (1988).
- 41.- Kneussel, M.P. and Richardson, J.B.: Alpha-adrenergic receptors in human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* **45**:307-311, (1978).
- 42.- Kyung, H.L. and Murlas, C.: Ozone induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs is abolished by BW 755C or FPL 55712 but not by indomethacin. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**:1005-1009, (1985).
- 43.- Lee, Y., Kawai, H., Shiosaka, S., Takami, K., Kiyama, H., Hillyard, C.J., Girgis, S., MacIntyre, I., Emerson, P.C. and Tohyama, M.: Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **330**:194-196, (1985).
- 44.- Li, C.G. and Rand, M.J.: Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electric field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **104**:565-569, (1991).
- 45.- Lundberg, J.M. and Saria, A.: Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand.* **116**:473-476, (1982).
- 46.- Lundberg, J.M.: A substance P antagonist inhibits vagally induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea-pig. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**:1120-1124, (1983).
- 47.- Lundberg, J.M., Marling, C.R. and Saria, A.: Substance P and capsaicin induced contraction of human bronchi. *Acta Physiol. Scand.* **119**: 49-53, (1983).

- 48.- Lundberg, J.M., Harenkrug, J., Hokfelt, T. et al.: Coexistence of peptide histidine isoleucine (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man. Peptides 5:593-606, (1983).
- 49.- Lundberg, J.M., Saria, A., Lundblad, L. et al.: Bioactive peptides in capsaicin-sensitive C-fiber afferents of the airways: functional and pathophysiological implications. In: Kaliner, M., Barnes, P.J., eds. The airways: neural control in health and disease. New York: Marcel Dekker, 417-445, (1987).
- 50.- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Hua, X., Hokfelt, T. and Fischer, J.A.: Coexistence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. Eur.J.Pharmacol. 108:315-319, (1985).
- 51.- Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P. and Santicioli, P.: Tachykinin receptors and noncholinergic bronchoconstriction in the guinea-pig isolated bronchi. Am.Rev.Respir.Dis. 144:363-367, (1991).
- 52.- Martin, J.G., Wang, A., Zacour, M. and Biggs, D.F.: The effects of vasoactive intestinal polypeptide on cholinergic neurotransmission in isolated innervated guinea pig tracheal preparations. Respir.Physiol. 79:111-122, (1990).
- 53.- Martins, M.A., Shore, S.A., Gerard, N.P., Gerald, C. and Drazen, J.M.: Peptidase modulation of the pulmonary effects of tachykinins in tracheal superfused guinea pig lungs. J.Clin.Invest. 85:170-176, (1990).
- 54.- Marling, C.R., Theodorsson-Norheim, E. and Lundberg, J.M.: Occurrence and effect of multiple tachykinins: substance P, neurokinin A, and neuropeptide K in human lower airways. Life Sci. 40:1633-1643, (1987).
- 55.- McDonnell, W.F., Horstman, D.H., Abdul-Salaam, S., Raggio, L.J. and Green, J.A.: The respiratory responses of subjects with allergic rhinitis to ozone exposure and their relationship to nonspecific airway reactivity. Toxicol. Indust. Health 3: 507-517, (1987).
- 56.- Miller, P.D., Ainsworth, D., Lam, H.F. and Amdur, M.O.: Effect of ozone exposure on lung functions and plasma prostaglandin and thromboxan concentrations in guinea pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 88:132-140, (1987).

- 57.- Montañó, L.M., Jones, G.L., O'Byrne, P.M. and Daniel, E.E.: Effect of ozone exposure in vivo on response of bronchial rings in vitro: role of intracellular Ca^{2+} . J.Appl.Physiol. **75**(3):1315-1322, (1993).
- 58.- Montañó, L.M., Hong, E. and Selman, M.: Difference in beta-blockade on the inhibitory response of cervical and thoracic tracheas to electrical stimulation. Med.Sci.Res. **16**:193-194, (1988).
- 59.- Montañó, L.M., Vargas, M.H. y Selman, M.: Broncoconstricción inducida por estimulación vagal en cobayos: influencia de los neurotransmisores no colinérgicos. Rev. del INER Marzo:4-9, (1989).
- 60.- Montañó, L.M., Selman, M. y Hong, E.: Diferentes efectos de la adrenalina sobre el músculo liso traqueal de *Erythrocebus patas*: predominio de los receptores adrenérgicos alfa. Arch.Invest.Med. **16**:169-174, (1985).
- 61.- Murlas, C.G., Murphy, T.P. and Chodimella, V.: O_3 -induced airway muscle hyperresponsiveness in the guinea pig. J.Appl.Physiol. **60**:7-13, (1990).
- 62.- Murlas, C.G. and Rouni, J.H.: Sequence of pathologic changes in the airway mucosa of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity. Am. Rev. Respir. Dis. **131**:314-320, (1985).
- 63.- O'Byrne, P.M., Walters, E.H., Gold, B.D., Aizawa, H.A., Fabbri, L.M., Alpert, S.E., Nadel, J.A. and Holtzman, M.J.: Neutrophil depletion inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure. Amer. Rev. Respir. Dis. **130**:214-219, (1984).
- 64.- Partanen, M., Laitinen, A., Hervonen, A., Toivanen, M. and Laitinen, L.A.: Catecholamines and acetylcholinesterase containing nerves in human lower respiratory tract. Histochemistry **76**:175-188, (1982).
- 65.- Pino, M.V., McDonald, R.J., Hyde, D.M., Berry, J., Joad, J. and Tarkington, B.: Ozone exposure causes increased airway resistance in isolated perfused rat lungs. Am. Rev. Respir. Dis. **141**(4):A252, (1990).
- 66.- Quigley, C., Fuller, R.W., Dixon, C.M.S. and Barnes, P.J.: Inhaled acetylcholinesterase inhibitors cause dose-related bronchoconstriction in asthmatic and normal subjects (abstract). Am. Rev. Respir. Dis. **131**:A283, (1985).

- 67.- Regoli, D.: Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.* 40:66, (1987).
- 68.- Richardson, J.B.: Nonadrenergic inhibitory innervation of the lung. *Lung* 159:315-322, (1981).
- 69.- Richardson, J.B.: Nerve supply to the lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119:785-802, (1979).
- 70.- Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fourniezalwski, M.C. and Beaumont, A.: Neutral endopeptidase-24.11-Structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 45:87-146, (1993).
- 71.- Rosenfeld, M.G., Memmond, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.V., and Evans, R.M.: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature* 304:129-135, (1983).
- 72.- Said, S.I.: Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide. *Exp. Lung Res.* 3:343-348, (1982).
- 73.- Said, S.I.: Neuropeptides as modulators of injury and inflammation. *Life Sci.* 47:PL19-PL20, (1990).
- 74.- Schweisfurth, H.: Umweltschadstoff Ozon. *Dtsch. Med. Wschr.* 119:351-355, (1994)
- 75.- SEDUE. Informe sobre el estado del medio ambiente en México, 1985.
- 76.- Segura, P.: Hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo por exposición a ozono. Características y mecanismos de producción. Tesis de Maestría. *Ins. de Inv. Biomédicas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1994).
- 77.- Sheppard, D.: Mechanisms of acute increases in airway responsiveness caused by environmental chemicals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81:128-132, (1988).
- 78.- Shields, R.L. and Gold, W.M.: Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious guinea pig. *Environ. Res.* 42:435-445, (1987).
- 79.- Skidgel, R.A., Engelbrecht, A., Johnson, A.R. and Erdos, E.G.: Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:767-776, (1989).
- 80.- Tatemoto, K.: PHI-a new brain-gut peptide. *Peptides* 5:151-154, (1984).
- 81.- Tucker, J.F., Brave, S.R., Charalambous, L., Hobbs, A.J. and Gibson, A.: L-N^o-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea pig isolated tracheal

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

smooth muscle. Br.J.Pharmacol. 100:663-664, (1990).

82.- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants. 1: 1-9, (1993).

83.- Walpole, R.E. y Myers, R.H.: Probabilidad y estadística para ingenieros. Edit. McGraw Hill. 3a. ed., México, 1986.

84.- Ward, J.K., Belvisi, M.G., Springall, D.R., Abelli, L., Tadjkarimi, S., Yacoub, M.H., Polak, J.M. and Barnes, P.J.: Nitric oxide (NO) mediated i-NANC responses in human airway smooth muscle are reduced in distal airways-correlation with NO-immunoreactive nerves. In: The American Thoracic Society, Abstracts on Disk, International Conference. (A593), (1994).

85.- Watson, N. and Eglén, R.M.: Effects of muscarinic M2 and M3 receptor stimulation and antagonism of responses to isoprenaline of guinea-pig trachea in vitro. Br.J.Pharmacol. 112:179-187, (1994).

86.- Webber, S.E.: The effects of peptide histidine isoleucine and neuropeptide Y on mucous volumen output from ferret trachea. Br.J.Pharmacol. 55:40-45, (1988).

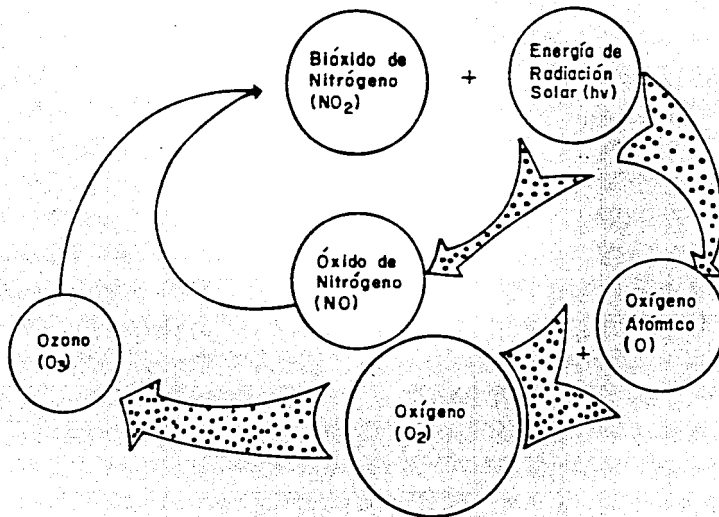


FIGURA 1: Ciclo Fotolítico del NO₂

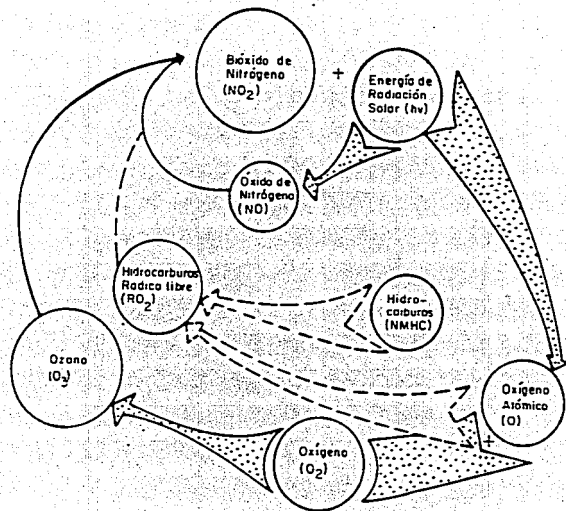


FIGURA 2: Interacción de los Hidrocarburos con el Ciclo Fotoquímico del NO_2

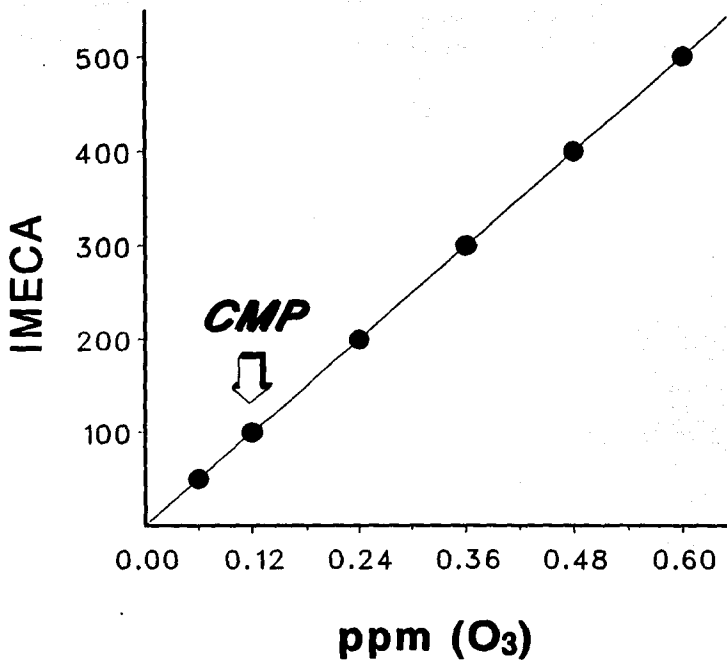


FIGURA 3: Equivalencia del IMECA con ppm.
CMP=Concentración Máxima Permitida

**CUADRO 1. EQUIVALENCIA DE LA CONCENTRACION DE OZONO CON EL
IMECA**

IMECA	CALIDAD DEL AIRE	PPM DE OZONO, MAXIMO POR HORA
0-50	Buena	0.06
51-100	Satisfactoria	0.07-0.11*
101-200	No Satisfactoria	0.12-0.23
201-300	Mala	0.24-0.35
301-500	Muy Mala	0.36-0.60

* Máximo permitido.

CUADRO 2. PRINCIPALES CONTAMINANTES

CONTAMINANTES	CARACTERISTICAS	FUENTES PRINCIPALES	EFFECTOS SOBRE LA SALUD
Partículas suspendidas totales (PST)	Partículas sólidas o líquidas dispersas en la atmósfera (diámetro de 0.3 a 10 micras) como polvo, cenizas, hollín, partículas metálicas, cemento, polen.	Combustión industrial y doméstica usando carbón, combustóleo y diesel. Procesos industriales. Incendios. Erosión eólica. Erupciones volcánicas.	Irritación de las vías aéreas. Su acumulación en los pulmones puede originar enfermedades como silicosis y asbestosis; agravan otras como el asma y las cardiovasculares.
Dióxido de azufre (SO ₂)	Gas incoloro con olor picante que al oxidarse y combinarse con agua forma ácido sulfúrico, principal componente de la lluvia ácida.	Combustión de carbón, diesel, combustóleo y gasolina que contienen azufre. Fundición de vetas metálicas ricas en azufre. Procesos industriales. Erupciones volcánicas.	Irritación de la conjuntiva y mucosa de tracto respiratorio; disminuye la función pulmonar y puede agravar el asma, la bronquitis crónica y el enfisema.
Hidrocarburos (HC)	Compuestos orgánicos que contienen carbono e hidrógeno en estado gaseoso. Se pueden combinar en presencia de la luz solar con óxidos de nitrógeno y forman el smog fotoquímico.	Combustión incompleta de combustibles y sustancias que contienen carbono, procesamiento, uso de compuestos del petróleo como la gasolina y los solventes orgánicos, incendios, reacciones químicas en la atmósfera.	Trastornos diversos sobre el sistema respiratorio. Algunos hidrocarburos se consideran carcinogénicos.
Oxidantes fotoquímicos: ozono (O ₃)	Compuestos gaseosos incoloros producidos en presencia de la luz solar. Oxidan materiales no inmediatamente oxidables por oxígeno gaseoso.	Reacciones atmosféricas de hidrocarburos y óxidos de nitrógeno bajo la influencia de la luz solar.	Irritación de la conjuntiva y mucosa respiratoria. En personas susceptibles pueden incrementar los cuadros de broncoespasmo y aparición de crisis asmáticas.
Monóxido de carbono (CO)	Gas incoloro, insípido y no irritante	Combustión incompleta de combustibles y otras sustancias que contienen carbón; incendios.	Se combina con la hemoglobina formando carboxihemoglobina, compuesto en el que el pigmento sanguíneo pierde su capacidad de transportar oxígeno. Dependiendo de su concentración puede provocar cefalea, fatiga, somnolencia y hasta depresión respiratoria, cardíaca, coma y muerte en el caso de intoxicación severa.
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	Gas café-rojizo de olor picante	Combustión a alta temperatura en industrias y vehículos; tormentas eléctricas.	Irrita la mucosa respiratoria. Agrava diversos padecimientos respiratorios y cardiovasculares.
Plomo (Pb)	Metal pesado no ferroso, se presenta en forma de vapor, aerosol o polvo	Combustión de gasolina que contiene plomo, minería, fundición y procesos industriales.	La mucosa respiratoria absorbe el plomo a lo largo de toda su extensión, incluso en las vías nasales.

CUADRO 3. INDICE IMECA Y RECOMENDACIONES A LA POBLACION

INDICE (IMECA)	RECOMENDACIONES
0-50	Situación muy favorable para la realización de todo tipo de actividades físicas
51-100	Situación muy favorable para la realización de todo tipo de actividades
101-200	Aumento de molestias en personas sensibles
201-300	Aumento de molestias e intolerancia relativa al ejercicio en personas con padecimientos respiratorios y cardiovasculares. Aparición de ligeras molestias en la población en general.
301-400	Aparición de diversos síntomas e intolerancia al ejercicio en la población sana.
401-500	Aparición de diversos síntomas e intolerancia al ejercicio en la población sana.
501 ó más	(No se describe)

CUADRO 4
NEUROPEPTIDOS EN EL TRACTO RESPIRATORIO
 Neurotransmisores del sistema inhibitorio NANC

PEPTIDO	LOCALIZACION	EFEECTO
VIP (VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE)	Fibras y ganglios nerviosos parasimpáticos	Broncodilatación, vasodilatación, secreción bronquial, degranulación de células cebadas, mediador de broncodilatación no adrenérgica.
OXIDO NITRICO (NO)	Tal vez las células endoteliales de los vasos sanguíneos u otros tipos celulares que presentan inmunoreactividad a la sintetasa del óxido nítrico	Relajación de los vasos sanguíneos y del músculo liso de las vías aéreas, la prevención de la coagulación sanguínea, y acciones como factor citotóxico liberado por los macrófagos.
PEPTIDO HISTIDINA ISOLEUCINA (PHI)/ METIONINA (PHM)	Fibras y ganglios nerviosos parasimpáticos	Muy similares a los de VIP

CUADRO 5
NEUROPEPTIDOS EN EL TRACTO RESPIRATORIO
 Neurotransmisores del sistema excitatorio NANC

PEPTIDO	LOCALIZACION	EFECTO
<p style="text-align: center;">SP (SUBSTANCIA P)</p>	<p>Nervios aferentes sensibles a capsaicina</p>	<p>Broncoconstricción secreción de glándulas submucosas, secreción de células cebadas, aumenta número de macrófagos y monocitos, vasopermeabilidad aumentada, mediador de la broncoconstricción no colinérgica</p>
<p style="text-align: center;">NKA (NEUROKININE A)</p>	<p>Nervios aferentes sensibles a capsaicina</p>	<p>Muy similares a los de SP</p>
<p style="text-align: center;">CGRP (CALCITONIN GEN RELATED PEPTIDE)</p>	<p>Nervios aferentes sensibles a capsaicina</p>	<p>Vasodilatación, facilitar la acción de SP; tal vez las mismas acciones de SP</p>

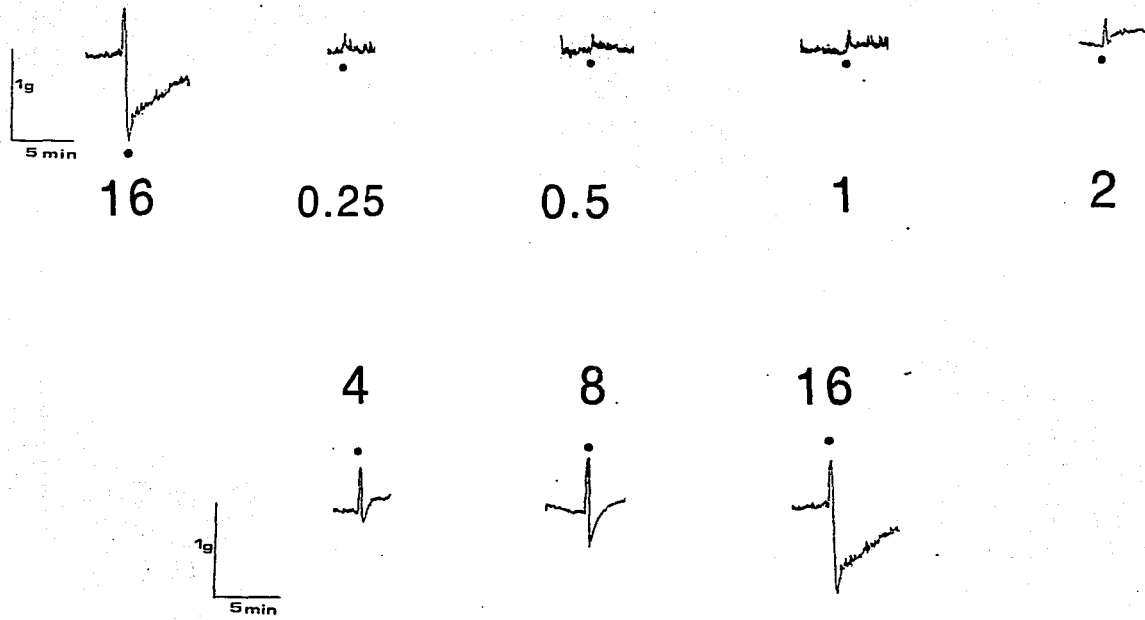


FIGURA 4: Respuesta de las Tráqueas Control a la Estimulación Eléctrica de Campo (100V, 2 ms, durante 10 segundos). Con el estímulo inicial de 16 Hz, se aprecia claramente hacia arriba de la basal, la contracción colinérgica y hacia abajo, la relajación adrenérgica y la del sistema i-NANC. Las respuestas se incrementan proporcionalmente a la frecuencia del estímulo eléctrico.

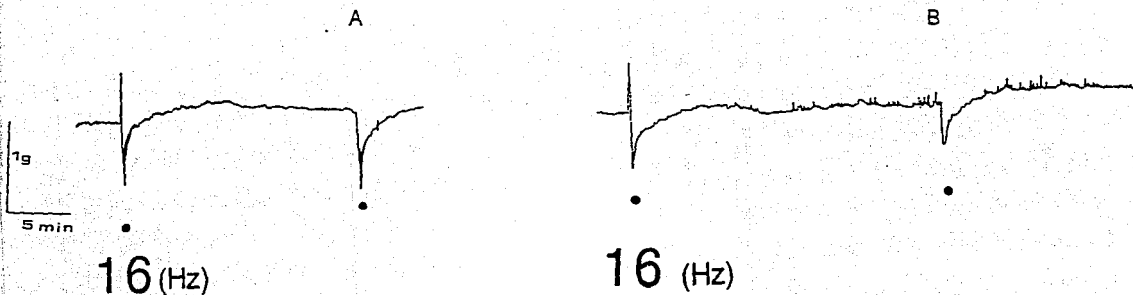


FIGURA 5: Respuesta de Tráqueas A) Con Atropina, B) Con Atropina y Propranolol a la Estimulación Eléctrica de Campo (100V, 2ms, durante 10 segundos). A) Se inhibe completamente la contracción colinérgica y únicamente se observan las relajaciones adrenergica y del sistema i-NANC. B) Se inhibe completamente la contracción colinérgica y la relajación adrenergica, y sólo se aprecia la relajación i-NANC.

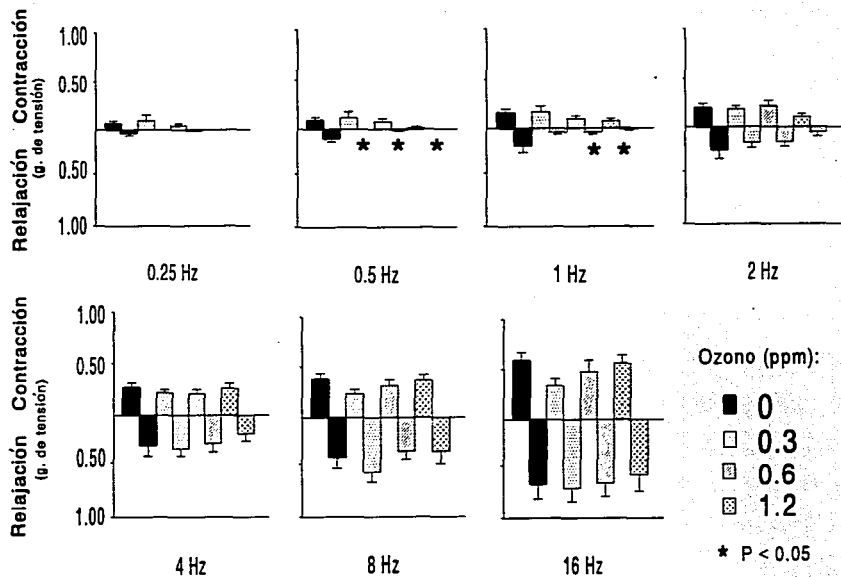


FIGURA 6: Efecto de las Diferentes Concentraciones de Ozono sobre las Respuestas del Músculo Liso Traqueal a la Estimulación Eléctrica de Campo. (100V, 2 ms, durante 10 segundos).

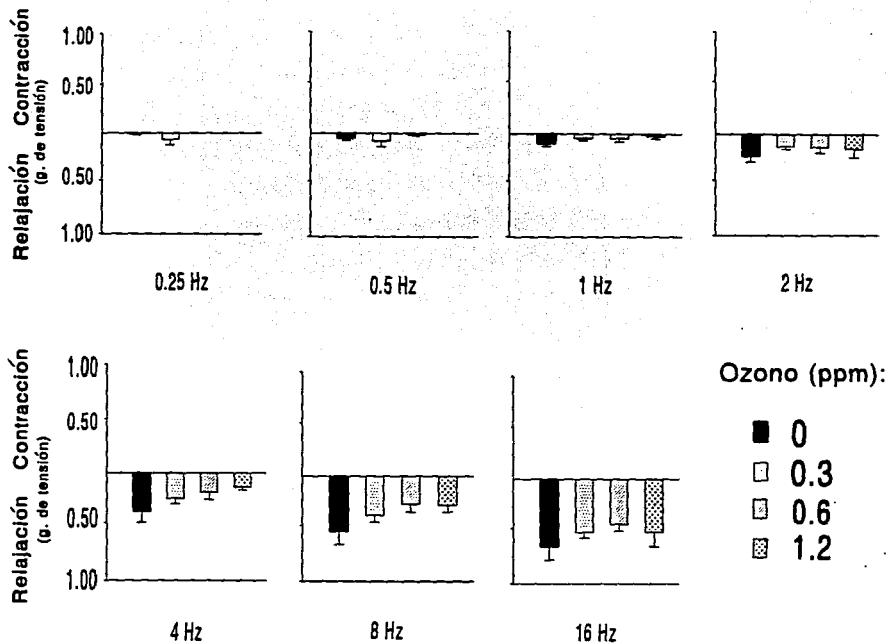


FIGURA 7: Efecto de las Diferentes Concentraciones de Ozono sobre las Respuestas del Músculo Liso Traqueal a la Estimulación Eléctrica de Campo. (100V, 2 ms, durante 10 segundos) en Preparaciones Previamente Incubadas con Atropina (2 μ m) y propranolol (10 μ m).

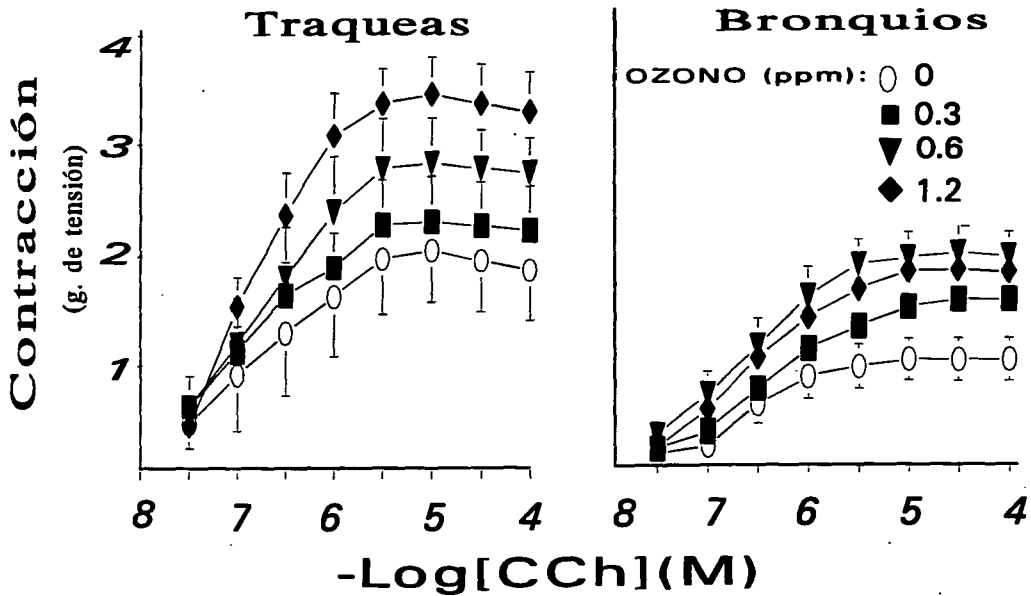


FIGURA 8: Efecto de la Exposición a Ozono sobre la Reactividad al Carbacol de las Preparaciones Traqueales y Bronquiales.

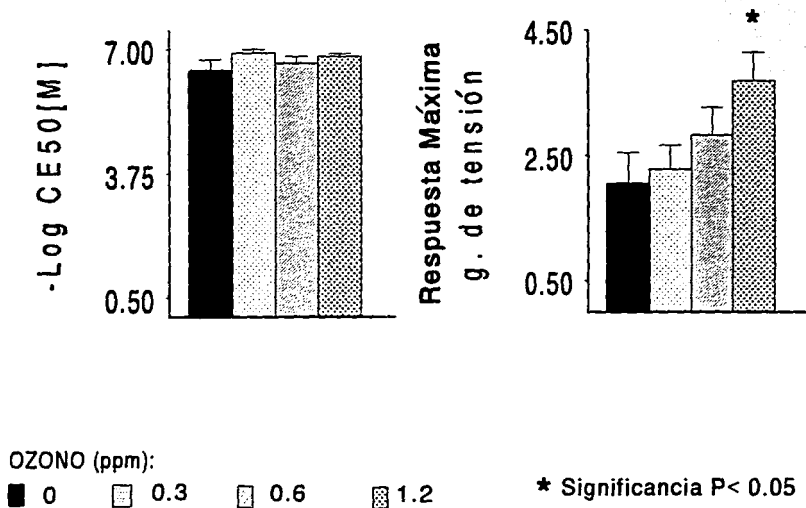


FIGURA 9: Efecto de la Exposición a Ozono sobre la Reactividad al Carbacol en el Músculo Liso Traqueal. La figura de la izquierda muestra la CE_{50} que expresa la concentración de carbacol necesaria para alcanzar 50% de la respuesta; no se encontraron diferencias significativas. La figura de la derecha representa la respuesta máxima que es la respuesta puntual más alta y que se grafica como gramos de tensión desarrollada por el tejido en respuesta al carbacol. La significancia ($P < 0.05$) en este parámetro se encontró para el tratamiento de 1.2 ppm de O_3 .

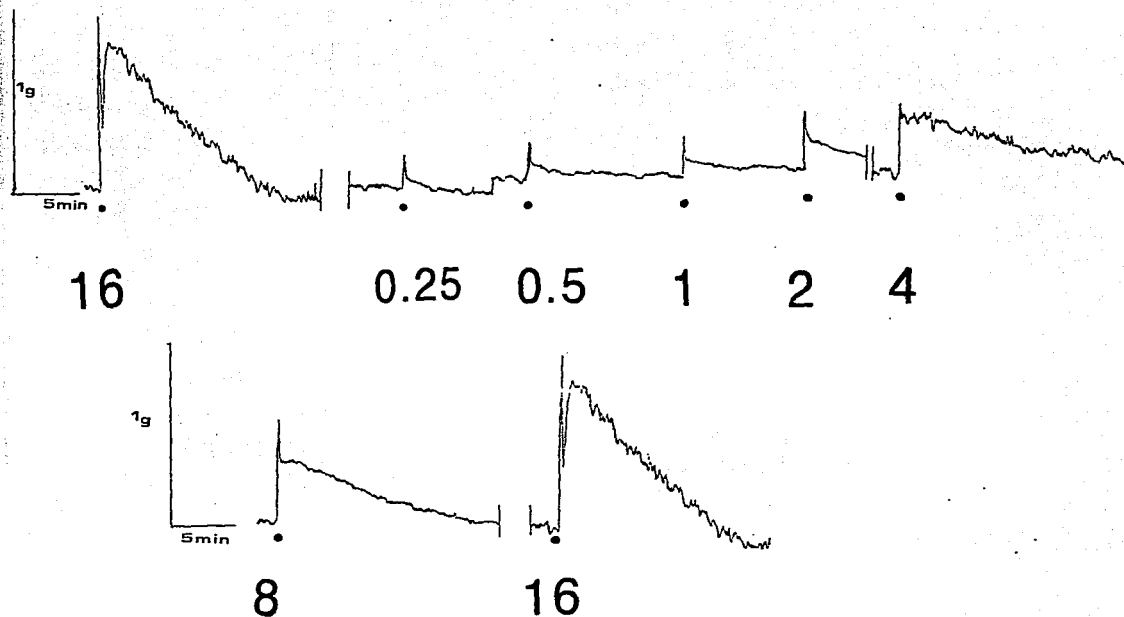


FIGURA 10: Respuestas Bronquiales a la Estimulación Eléctrica de Campo (100V, 2 ms, durante 10 segundos). Esta figura muestra la contracción colinérgica del bronquio, la cual se puede apreciar al inicio de la respuesta como una contracción rápida, y la contracción e-NANC, más lenta y en curva. Ambas respuestas crecen en proporción con la frecuencia del estímulo eléctrico.

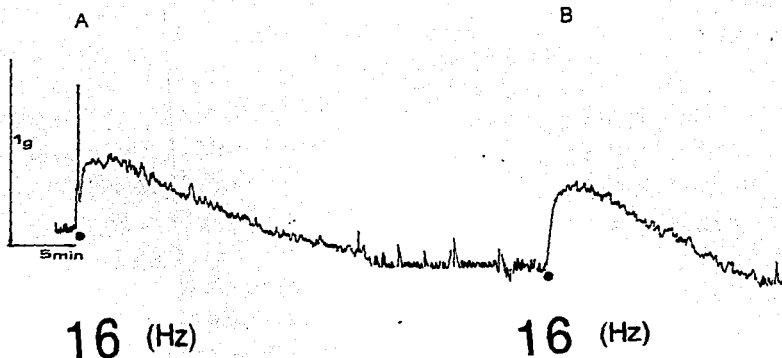


FIGURA 11: Respuestas Bronquiales A) Sin Atropina, B) Con Atropina, a la Estimulación Eléctrica de Campo. A) Es muy clara la contracción colinérgica rápida previa a la contracción del sistema e-NANC, más lenta. B) Aproximadamente 10 minutos después de la incubación del bronquio con atropina, se bloquea completamente la contracción colinérgica y únicamente se aprecia la contracción e-NANC.

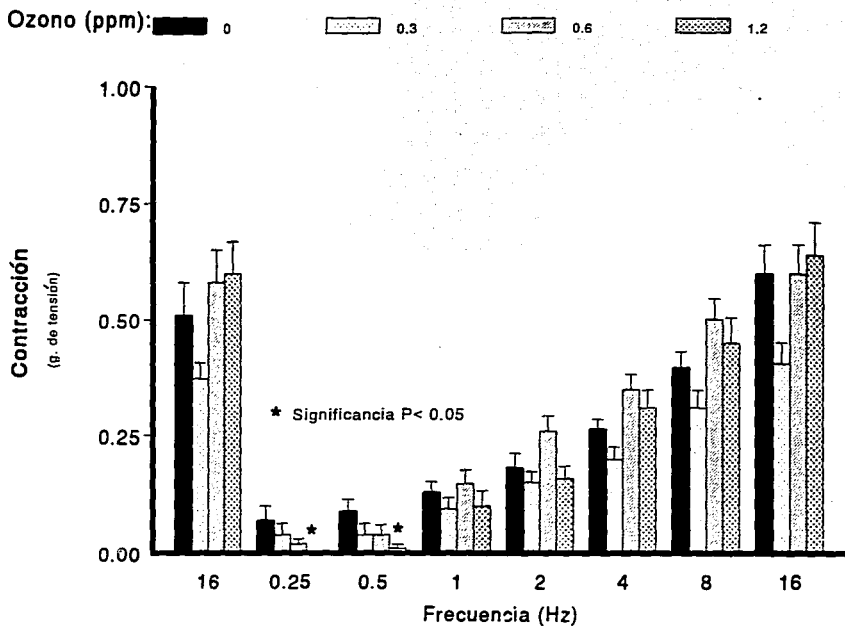


FIGURA 12: Efecto de la Exposición a Ozono sobre la Contracción Bronquial Colinérgica Inducida por la Estimulación Eléctrica de Campo.

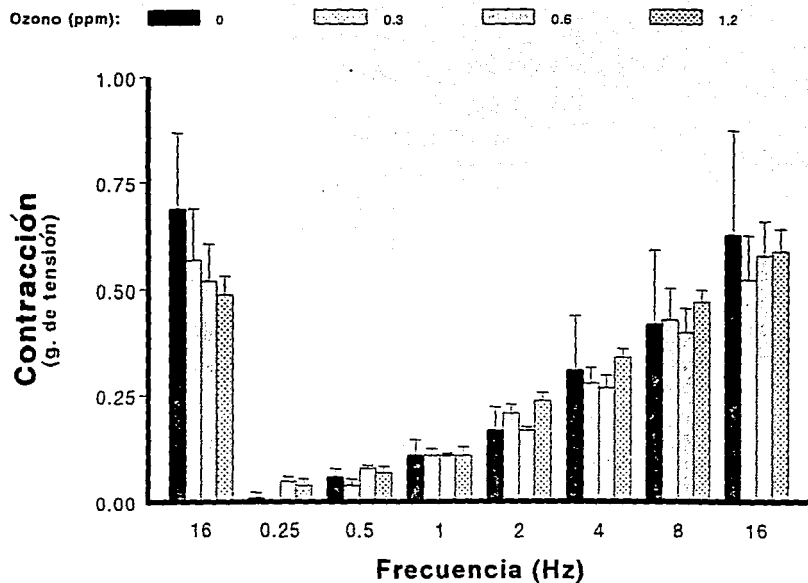


FIGURA 13: Efecto de la Exposición a Ozono sobre la Contracción Bronquial e-NANC Inducida por la Estimulación Eléctrica de Campo.

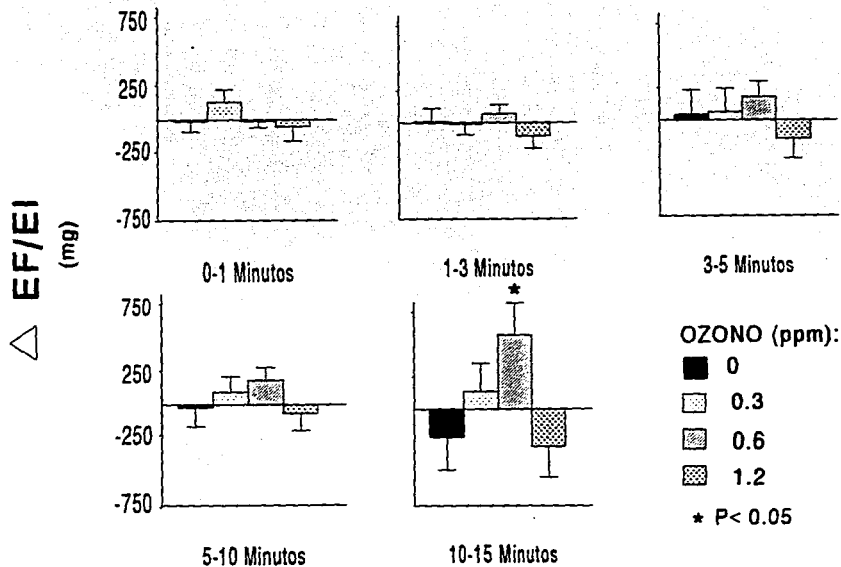


FIGURA 14: Índice entre Estímulo de 16 Hz Final e Inicial de Bronquios sin Atropina. Hacia arriba se grafican las diferencias positivas en miligramos (el estímulo final era mayor que el estímulo inicial) y hacia abajo las diferencias negativas en miligramos (el estímulo final era menor que el inicial); y se muestran divididas por periodos (0-1, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15 minutos). Entre el tratamiento de 0 ppm y el de 0.6 ppm de ozono, hubo significancia ($P < 0.05$) en el intervalo de 10 -15 minutos.

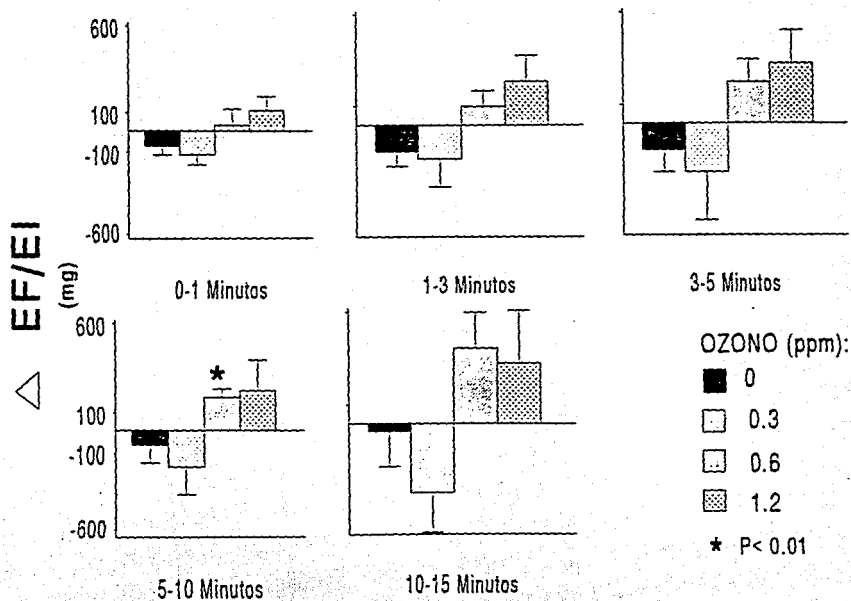
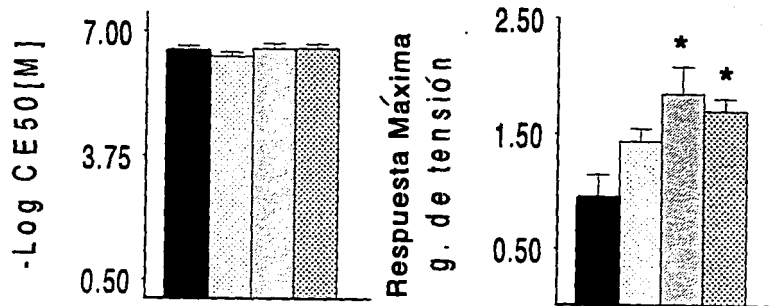
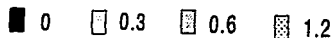


FIGURA 15: Índice entre Estimulo de 16 Hz Final e Inicial de Bronquios con Atropina. Hacia arriba se grafican las diferencias positivas en miligramos (el estimulo final era mayor que el inicial) y hacia abajo las diferencias negativas en miligramos (el estimulo final era menor que el inicial); y se muestran divididas por periodos (0-1, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15 minutos). En este caso, la diferencia ($P < 0.01$) se halló entre el tratamiento de 0 ppm de ozono y el de 0.6 ppm, para el intervalo de 5-10 minutos.



OZONO (ppm):



* Significancia $P < 0.05$

FIGURA 16: Efecto de la Exposición a Ozono sobre la Reactividad al Carbacol en el Músculo Liso Bronquial. La figura de la izquierda muestra la CE_{50} que expresa la concentración de carbacol necesaria para alcanzar 50% de la respuesta; en este parámetro no hubo diferencia significativa. La figura de la derecha representa la respuesta máxima que es la respuesta puntual más alta y que se grafica como gramos de tensión desarrollada por el tejido en respuesta al carbacol. La significancia ($P < 0.05$) se halló en la respuesta máxima al carbacol de los tratamientos 0.6 y 1.2 ppm de ozono.