

39
23



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CAMBIOS ELECTROMICROSCOPICOS EN EL EPITELIO
NASAL DE PERROS EXPUESTOS A OZONO Y OTROS
CONTAMINANTES EN EL SUROESTE DE LA CIUDAD DE
MEXICO. ESTUDIO COMPARATIVO CON UNA POBLACION
CANINA NO EXPUESTA.**

T E S I S
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO
Z O O T E C N I S T A
P O R
LUIS ENRIQUE FERNANDEZ MAYA

ASESORES: M.C. LILIAN CALDERON GARCIDUERAS
M.V.Z. ARTURO CARMONA MANCILLA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dedico esta tesis ...

A Dios, porque a pesar de mis muchos errores siempre ha estado conmigo y porque ahora me ha permitido dar un paso más en el camino de mi vida.

Con todo mi amor a la memoria de mi madre, María Dolores Maya González, quien supo dejarme la mejor y más bella herencia: todo su amor, su ejemplo, una vida llena de felicidad y la formación para poder afrontar la vida.

A mi hermano Juan Carlos por toda su confianza, cariño y apoyo.

A mi abuelita María Dolores González de Maya por ser mi segunda madre.

A Silvia con todo mi amor, por todo lo que ella representa para mí: amor, comprensión, confianza, compañía y deseos de vivir.

A mi padre, tías, tíos, primos, sobrinos y mi cuñada, especialmente a mi madrina María Concepción Maya, y a mis sobrinos Alma Patricia y Juan Carlos, a todos ellos por su confianza, compañía y apoyo.

A la memoria de mi querida maestra Angélica Ortigoza Mora, quien me enseñó que el arte, a través de la música es un alimento para el espíritu.

A mis maestros Lupita Campos y Gabriel Saldivar, por permitirme seguir disfrutando de la música y de todo lo hermoso

que ella me ha dejado y por dejarme seguir siendo parte de la familia que es el Coro Académico de la UNAM.

A todos mis amigos, especialmente a Sandra, Fernando, Josefina, Norma, Carlos S., Julieta, Leo, Miguel Angel, Luis Ramón, Carlos G., Sergio, Greta, Cecilia, Rosalía, Pilar, Héctor, Mario, Clara , Adela y a la familia Ramírez Almazán por su amistad y por estar conmigo en los momentos difíciles y en los momentos felices como este.

Expreso mi más sincera gratitud a ...

MVZ Clara Loza Arvizu

Biol. Gabriel López V.

Biol. Rosa María Viguera

Biol. Leticia Ramírez

MVZ Sergio García C.

Quienes con su valiosa y entusiasta colaboración, sus conocimientos e ideas me ayudaron a poder realizar éste trabajo que es la culminación de muchas horas de esfuerzo.

CONTENIDO

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSION	20
LITERATURA CITADA	31
FIGURAS	38
CUADROS	50

RESUMEN.

FERNANDEZ MAYA, LUIS ENRIQUE. Cambios electromicroscópicos en el epitelio nasal de perros expuestos a ozono y otros contaminantes en el suroeste de la ciudad de México. Estudio comparativo con una población canina no expuesta (bajo la dirección de M.C. Lilián Calderón Garcidueñas y M.V.Z. Arturo Carmona Mancilla).

Para demostrar los efectos a nivel histológico y ultraestructural de una atmósfera contaminada con altos niveles de O_3 en el epitelio respiratorio nasal, se analizaron biopsias nasales de 10 perros residentes en el suroeste de la ciudad de México (SOCM) como población expuesta y 3 perros residentes en el puerto de Veracruz como población control. Los perros expuestos presentaron pérdida de cilios, hiperplasia secretoria, metaplasia escamosa e infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares, de los cuales solo la metaplasia escamosa y la inflamación fueron cambios significativos al compararlos con la población control. A nivel ultraestructural se observaron cilios cortos y con formas anormales así como cilios normales con su estructura microtubular normal, las células caliciformes presentaron dilatación del aparato de Golgi y aumento en la cantidad de gránulos secretorios, las células escamosas metaplásicas presentaron desproporción en el tamaño núcleo-citoplasma con escotaduras en la membrana nuclear. En este estudio se observó que los perros presentan principalmente cambios adaptativos y una respuesta inflamatoria crónica debido a la exposición prolongada a la atmósfera de la ciudad de México. Tales cambios en el aparato mucociliar con alteración en la producción de moco y en la fisiología nasal llevan a alteraciones en el resto del aparato respiratorio pudiendo así favorecer la presencia de enfermedades infecciosas y neoplásicas como se ha observado en otras especies.

INTRODUCCION.

La contaminación del aire es un problema mundial, relativamente reciente en países en desarrollo, especialmente en las áreas urbanas. Ciudades como Lagos, El Cairo, Karachi, Atenas, Santiago de Chile, Sao Paulo y la ciudad de México padecen problemas similares: rápida urbanización, uso inadecuado de la tierra y transporte insuficiente (17).

La contaminación fotoquímica por oxidantes conocida como "smog" es una mezcla de gases y aerosoles principalmente ozono (O_3), dióxido de nitrógeno (NO_2) y nitratos (NO_3) (4), de los cuales el O_3 es el componente principal ya que afecta a un gran número de sistemas biológicos (25).

En el suroeste de la ciudad de México (SOCM) 9.5 millones del total de los habitantes están expuestos a diferentes grados de contaminación por O_3 , por arriba de la norma mexicana de la calidad del aire que es de 0.11 partes por millón (ppm) promedio máximo, en una hora una vez al año (4).

El O_3 , junto con otros oxidantes como el nitrato de peroxiacetilo y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son producidos fotoquímicamente por acción de la energía ultravioleta del

sol sobre las emisiones de óxidos de nitrógeno (NO_x) resultantes de procesos de combustión a altas temperaturas así como de compuestos orgánicos reactivos emitidos por el uso de solventes y evaporación de combustibles. Otras fuentes precursoras de O_3 son vapores reactivos como hidrocarburos oleofinicos y m-xileno, así como el metano que es el principal producto de la degradación biológica natural (22). El gas licuado de uso doméstico liberado a la atmósfera sin ser quemado juega un papel muy importante en la producción de O_3 en el valle de México (2).

En el valle de México las concentraciones de O_3 y su distribución cambiaron substancialmente de 1985 a 1987 y años posteriores. Esto coincidió con el cambio de gasolinas a partir de 1986 cuando con el fin de reducir el plomo presente en las partículas en suspensión se substituyó el tetralquilplomo por oleofin-amina y compuestos aromáticos en la nueva gasolina denominada NOVA-PLUS (17) con lo que se produce un cambio radical en la composición de los compuestos orgánicos reactivos y en la cantidad de NO_x emitidos en la combustión pues eran necesarias otras condiciones en el diseño de los motores (4).

En 1988 con el fin de reducir el monóxido de carbono e hidrocarburos totales en las gasolinas NOVA-PLUS y EXTRA se les adiciona metil-terbutil-éter (MTBE) produciéndose así formaldehído que es otro precursor del O_3 principalmente en horas de la mañana y de la noche (4).

Finalmente en 1991 se introduce otra nueva gasolina (MAGNA-SIN) para uso exclusivo de autos modelo 1991 con convertidor catalítico, pero se comete el error de instruir al público de que ésta gasolina era optativa para modelos 1986-1990, pues el uso de ésta gasolina está prohibido en autos sin convertidor catalítico pues las emisiones de compuestos orgánicos aún más reactivos y de NO_x quedan totalmente fuera de control (4).

Así los rebases a la norma mexicana de la calidad del aire que para 1985 eran casi nulos (8 excedencias en total) aumentaron a 636 para 1987 (un incremento del 9,086% en solo dos años), 670 en 1988 y casi 700 en 1989 (17).

El mecanismo fotoquímico-meteorológico de la formación de O_3 depende de las condiciones atmosféricas de la cuenca atmosférica de la zona metropolitana de la ciudad de México. Hay gran evidencia de la acumulación nocturna de

contaminantes precursores de O_3 , por arriba de la capa de inversión de la temperatura de la ciudad de México. Al amanecer se inicia el calentamiento de la superficie por el sol y la capa de inversión poco a poco se va rompiendo hasta que se da un vigoroso mezclado vertical entre las capas inferiores de la inversión y las superiores, produciéndose así una reinyección de precursores adicionales a las concentraciones matutinas de precursores de O_3 , (4).

Cada mes de los años 1987, 1988 y 1989 se dieron concentraciones que excedieron la norma de calidad (0.11 ppm) por arriba de 0.12 ppm sin dependencia aparente de factores meteorológicos (estabilidad atmosférica, lluvias y vientos), mientras que los datos superiores a 0.18 ppm mostraron una dependencia de la época de frío (otoño e invierno) (17) (Cuadro 1).

La trayectoria de las masas de aire (noroeste-suroeste) contribuyen a la distribución de las concentraciones de O_3 , por lo que es posible que las mayores concentraciones se localicen en el Ajusco y Contreras (17).

Un gran número de efectos respiratorios causados por O_3 , han sido descritos en animales y humanos (19, 22, 35). Estos

efectos han sido demostrados tanto en cortos períodos de tiempo (3, 9, 16, 38), como en períodos prolongados donde el único contaminante es el O_3 (16,28,34) y en exposiciones crónicas a ambientes urbanos con altos niveles de éste gas (5,6,7,8,21).

Así mismo, esos cambios han sido observados a diferentes niveles del tracto respiratorio como son el epitelio nasal (5,6,7,8,9,14,16,18,20,21); tráquea, bronquios y bronquiolos (3,28,34,38).

La cavidad nasal es un órgano altamente complejo (27). Su estructura anatómica es más compleja en roedores y perros que en monos y humanos (15). El epitelio nasal de perros al igual que el de monos y humanos cuenta con cuatro tipos principales de población celular: epitelio estratificado escamoso en el vestíbulo, una zona de transición entre el epitelio escamoso y el respiratorio con células ciliadas, el epitelio respiratorio que cubre casi toda la cavidad nasal y el epitelio olfatorio que cubre la parte dorsoposterior de ésta (15), cada uno con diferente grado de sensibilidad a sustancias químicas inhaladas (20).

El epitelio nasal es la primera parte de las vías respiratorias expuestas a irritantes inhalados y otros contaminantes, el cual juega un papel muy importante en la protección del resto de las vías respiratorias pues absorbe gases y vapores hidrosolubles, limpiando las partículas impactadas y metabolizando los químicos inhalados, siendo más vulnerable a ciertos tóxicos (16), de los cuales varía el rango de captación según la especie animal y la sustancia inhalada (12,26,27), así en el perro la captación de O_3 por la cavidad nasal es de un 80 a 87% (39).

Estudios en la ciudad de México con humanos han revelado displasias en individuos con más de 60 días de residencia en el SOCM junto con otras alteraciones como pérdida severa del epitelio respiratorio normal, hiperplasia basal, metaplasia escamosa y proliferación vascular submucosa (5). También en ratas expuestas a un ambiente urbano se encontraron alteraciones en el epitelio respiratorio como hiperplasia secretoria, cambios en las características del moco producido y disminución en la cantidad de células ciliadas (21).

En monos expuestos 8 horas diarias durante 6 ó 90 días a 0.15 y 0.30 ppm de O_3 , se observó necrosis de células ciliadas, acortamiento de cilios e hiperplasia secretoria y

después de 90 días se observaron cambios en la ultraestructura de las células caliciformes (16).

En perros de la ciudad de México se han observado cambios en el epitelio pulmonar como metaplasia escamosa (11), e infiltrado inflamatorio principalmente de neutrófilos y linfocitos entre otros cambios, especialmente en el SOCM que es la zona con más altos niveles de O_3 y NO_2 (36).

Los perros constituyen un excelente modelo para estudiar el grado y los efectos de la exposición natural a contaminantes atmosféricos, pues de acuerdo con el tipo de contaminante que predomine en el ambiente al que están expuestos presentarán una determinada respuesta (36).

La hipótesis de trabajo predice que a diferencia de los animales control muestreados en una zona con bajos niveles de contaminación, las células del epitelio nasal de perros expuestos presentará cambios estructurales como resultado de la exposición crónica a contaminantes atmosféricos.

El objetivo del presente estudio es la demostración de cambios electromicroscópicos en el epitelio respiratorio nasal de perros expuestos a O_3 ambiental y otros

contaminantes en el suroeste de la ciudad de México, comparándolos con una población canina residente en una zona de baja contaminación atmosférica (Veracruz, Veracruz).

MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente estudio se realizó en la División de Patología Experimental de la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría (UI SI-INP).

Población estudiada.

Se tomaron biopsias nasales de un total de 30 perros procedentes de colonias de la delegación Tlalpan y 20 perros residentes en la ciudad de Veracruz, sin distinción de raza, sexo o peso, entre 6 meses y 5 años de edad, vacunados, desparasitados, clínicamente sanos lo cual se determinó al examen físico; se consideró su posible exposición a enfermedades infecciosas recientes al momento de la toma de la biopsia y se puso especial atención en detectar alteraciones respiratorias como tos, estornudos, descarga nasal así como la posible cercanía de fuentes emisoras de gases ó humos (humo de cigarro, talleres mecánicos, talleres de hojalatería y pintura, fábricas, máquinas fotocopiadoras u otros).

Los animales estudiados fueron divididos en dos grupos: el grupo de 30 perros expuestos a la atmósfera del SOCM como

población expuesta y el grupo de 20 perros residentes en una zona con bajos niveles de contaminación y diferentes características geográficas y meteorológicas como la ciudad de Veracruz como población control.

Toma de biopsias.

Para facilitar el manejo de los perros se aplicó a cada uno 0.1 ml/kg de hidrocloreto de xilacina al 2% (Rompun, Bayer) por vía intramuscular como tranquilizante.

Al animal ya tranquilizado se le introdujo a través del meato nasal dorsal una cucharilla de curetaje para la toma de biopsias nasales (Rhino-probe: ASI, Arlington, Texas) tan profundamente como fue posible con la cual se practicó una biopsia del epitelio respiratorio pseudoestratificado ciliado con células caliciformes (Figura 1).

Procesamiento del tejido.

Los tejidos obtenidos de aproximadamente 2 mm se colocaron en un tubo de Ependorff con gluteraldehído al 2.5% por un máximo de 2 horas, después de este período se cambiaron a buffer de fosfatos con pH de 7.2 a 7.4 en el que permanecieron en refrigeración hasta llegar al laboratorio.

Ya en el laboratorio se procedió al lavado de las mismas

con el buffer ya mencionado, 3 veces por 10 minutos cada vez.

Posteriormente se procedió a la posfijación con tetraóxido de osmio al 2% en dilución 1:1 con el mismo buffer por 2 horas. Se hicieron 3 lavados con buffer de fosfatos y se procedió a la deshidratación con alcoholes graduales al 70%, 80%, 90%, 96% y 100%.

Después se procedió a la inmersión en óxido de propileno, preinclusión en óxido de propileno e inclusión en Epon (glicidólico de éter) por 24 horas a temperatura ambiente.

Se realizaron los cortes semifinos con un ultramicrotomo (Ultracut-E, Sorvall) para ser teñidos con azul de toluidina y se procedió a su observación en el microscópio óptico para la elección del material para ser llevado a corte fino y ser observado al microscópio electrónico.

Exámen de cortes semifinos.

Los cortes semifinos fueron examinados sin tener acceso a la información clínica.

Las variables estudiadas fueron acortamiento de cilios, hiperplasia de células caliciformes, metaplasia escamosa y presencia de células inflamatorias.

El grado de severidad de los cambios observados fue clasificado como leve (+), moderado (++) y severo (+++) (Cuadro 4).

Así se eligieron los cortes semifinos y las áreas adecuadas para cortes finos y su posterior observación en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-109.

Se tomaron fotografías tanto de las secciones semifinas como de los cortes finos y éste fue el material final de análisis.

Análisis estadístico.

El grupo control se comparó con el expuesto utilizando la prueba de "t" para grupos independientes considerando una $p < 0.05$ por medio del paquete estadístico SPSS.

Para lo cual se asignó un valor numérico según el grado de severidad del daño siendo 1 (+), 2 (++) y 3 (+++), respectivamente,

RESULTADOS.

Calidad del aire.

El número de horas al año desde 1987 hasta 1994 en que se excedió la norma mexicana de la calidad del aire de 0.11 ppm por hora una vez al año para O_3 , así como el promedio de horas en que ésta se excedió se presentan en el Cuadro 1.

Las biopsias de perros expuestos fueron obtenidas en el período comprendido entre el 17 de julio y el 5 de agosto de 1995, en el que el promedio de horas con niveles superiores a 0.11 ppm de O_3 fue de 3.6 horas al día donde el nivel máximo fue de 0.349 ppm; ubicandose las horas de excedencia entre las 12 y las 15 horas del día (Cuadro 2).

Población estudiada.

De las 30 biopsias obtenidas en el SOCM y de las 20 obtenidas en el puerto de Veracruz, solo las de 10 perros expuestos y 3 controles presentaron las características requeridas.

Esto fué debido a que las cucharillas empleadas para este estudio están diseñadas para la obtención de biopsias nasales de humanos y a ciertas características anatómicas de los perros como estrechez de los meatos nasales por lo que

no en todos los casos fué posible llegar al hasta el área cubierta por epitelio pseudoestratificado ciliado.

Datos como la edad, sexo, raza, peso, localidad y tiempo de residencia se presentan en el Cuadro 3.

Análisis de cortes semifinos.

El Cuadro 4 muestra los resultados obtenidos al examinar los cortes semifinos.

Ninguno de los 3 casos controles presentó alteraciones como daño a las células ciliadas, hiperplasia secretoria, metaplasia escamosa (Figura 2) y solo en uno de ellos se observó un leve proceso inflamatorio lo cual fue evidente la presencia de algunos polimorfonucleares.

De los 10 casos expuestos 6 presentaron cilios normales, 2 presentaron pérdida de cilios (Figura 3) y en dos casos no se observaron células ciliadas.

Tres de los 10 casos presentaron algún grado de hiperplasia e hipertrofia de células secretoria. En éstos casos se observó un aumento en el número de células caliciformes así como en el tamaño de éstas, también se

encontró que los gránulos secretorios eran más grandes y un aumento en la cantidad de moco producido (Figura 4).

De los 10 casos expuestos, 9 presentaron un grado variable de reemplazamiento del epitelio respiratorio normal por células escamosas, es decir, metaplasia escamosa; el cual fue considerado de leve a moderado en la mayoría de los casos, y solo en 2 casos fué severo en los cuales el epitelio presentó características similares a las del epitelio escamoso normal presente en la región vestibular de la cavidad nasal pero que contenía células caliciformes bien desarrolladas, así como algunas células con características diferentes y que fueron consideradas remanentes del epitelio preexistente (Figura 5).

A diferencia de los casos control, en 9 de los 10 casos expuestos se pudo observar un proceso inflamatorio, evidente por la presencia de polimorfonucleares, el cual fue leve en la mayoría de los casos, moderado en uno y severo en dos (Figura 6).

Microscopía electrónica.

De los 13 cortes semifinos solo 4 fueron elegidos para la obtención de cortes finos y su posterior observación al microscopio electrónico de transmisión

Se evaluaron características relacionadas con la integridad ciliar, así como posibles cambios morfológicos en células escamosas y caliciformes.

No se encontraron alteraciones en las células de los casos control, en los que se observaron células ciliadas y células caliciformes normales (Figura 7).

Solo en un perro expuesto que a la microscopía de luz presentó pérdida severa de cilios se observó que éstos eran muy cortos y algunos presentaron formas anormales (Figura 8), además se encontraron células necróticas (Figuras 9); mientras que en otro caso no se observaron alteraciones.

Las células escamosas metaplásicas presentaron desproporción entre el tamaño del núcleo y el del citoplasma con escotaduras en la membrana nuclear (Figura 10).

Las células caliciformes presentaron dilatación en el aparato de Golgi, con aumento en la cantidad de gránulos secretorios y coalescencia de éstos lo que podría ser debido a la mayor producción de moco (Figura 11).

Análisis estadístico.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de "t", no se encontró diferencia significativa al comparar el grado de acortamiento de cilios entre el grupo control y el grupo expuesto ($p > 0.05$) (Figura 12).

Tampoco se encontró diferencia significativa entre el grado de hiperplasia secretoria presente en los casos expuestos comparándolos con los controles ($p > 0.05$) (Figura 12).

Por el contrario si se encontró una diferencia significativa al comparar el grado de severidad de la metaplasia escamosa el grupo control y el grupo expuesto ($p < 0.05$) (Figura 12).

También se encontró diferencia significativa al comparar la severidad de la inflamación de acuerdo con la cantidad de

células inflamatorias presentes entre el grupo control y el grupo expuesto ($p < 0.05$) (Figura 12).

DISCUSIÓN.

El enfoque central de éste estudio fue determinar si la atmósfera contaminada del SOCM, con altos niveles de O_3 , causa alteraciones histológicas y ultraestructurales en las células del epitelio nasal de perros y describir tales alteraciones.

El O_3 ejerce su efecto debido a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (33), especialmente de los ácidos palmítico, esteárico, linoléico, linolénico y araquidónico (1) con la consecuente producción de radicales libres de oxígeno como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales superóxido y oxígeno monovalente así como aldehídos, principalmente malonaldehído (23,31,33).

Las células poseen un sistema de protección constituido por enzimas que ayudan a mantener niveles fisiológicos de oxígeno (10). En pulmones de rata se observó que la exposición a O_3 producía alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes y que los cambios en la actividad de las enzimas dependía de la concentración y la duración de la exposición (29) ya que el O_3 provoca la oxidación de aminoácidos con la consecuente inactivación de enzimas como

la superóxido desmutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (25) y otras enzimas como las endonucleasas (10).

Tanto el O_3 como los productos de la oxidación pueden interactuar con el ADN alterando su estructura y su replicación (33) e inactivando a las endonucleasas que intervienen en su reparación (10), además los productos de la descomposición oxidativa pueden actuar como factores clastogénicos, es decir, compuestos de bajo peso molecular que rompen los cromosomas (10).

Es importante considerar que el epitelio respiratorio presenta variaciones no solo entre sus diversas zonas, sino entre especies y por lo tanto la respuesta a los tóxicos inhalados varía (15), así se sabe que el epitelio respiratorio de perros es más resistente que el de roedores (34), que a su vez es más resistente que el del hombre, el cual es más resistente que el del mono (25).

Ratas expuestas durante 6 meses a una atmósfera urbana presentaron daño al aparato ciliar del epitelio que recubre el septo nasal (21). Así mismo, estudios de laboratorio realizados en macacos expuestos únicamente a O_3 (0.15 y 0.30 ppm) por 8 horas diariamente durante 6 días demostraron la presencia de necrosis de células ciliadas y acortamiento de

cilios (16), cambios similares también fueron encontrados en el epitelio traqueal de macacos expuestos continuamente por 3 y 7 días a 0.64 ppm de O_3 (38).

También éstos cambios fueron observados en perros expuestos por 18 meses a dióxido de azufre (32).

Las vías aéreas pulmonares de gatos expuestos por 4.7 y 6.6 horas a 0.26, 0.50 y 1.0 ppm de O_3 , se presentó descamación del epitelio ciliado, vacuolización de células ciliadas y conformación anormal de las mitocondrias (3).

Aunque en este estudio no se observó una diferencia significativa al comparar el grado de severidad de éste cambio entre la población expuesta y la población control quizás debido a lo reducido de ambas poblaciones, en dos casos si se observó acortamiento de cilios, tanto a nivel histológico como ultraestructural. A nivel histológico se observó pérdida severa de cilios y a nivel subcelular se observó acortamiento de éstos y algunos presentaron formas anormales similares a las encontradas en las vías pulmonares de ratones expuestos diariamente por 2 horas durante 80 días a concentraciones tan altas como 2.5 ppm y que son similares a las descritas en casos de rinitis atrófica porcina (28), y en vías pulmonares de gatos expuestos a O_3 (3).

Algunos autores sugieren que la pérdida de cilios es un cambio reversible no necesariamente ligado a necrosis de la célula (38).

Estadísticamente tampoco se observó una diferencia significativa al comparar el grado de severidad de la hiperplasia entre los dos grupos estudiados, sin embargo esta estuvo presente.

La hiperplasia secretoria es una respuesta que puede servir al epitelio para protegerlo de una subsecuente exposición pues la dosis del tóxico que llegará al tejido depende de su concentración en el lumen, su solubilidad en los líquidos de recubrimiento y de la cantidad de moco que lo protege por lo que el aumento en la cantidad de células secretorias y el aumento en la cantidad de moco producido pueden ser resultado de una respuesta adaptativa a niveles dañinos de O_3 (18) u otros contaminantes como el dióxido de azufre (32).

A la observación en el microscopio electrónico de transmisión se observó dilatación del aparato de Golgi de las células secretorias con aumento en la cantidad y el tamaño de las vesículas secretorias. En las células nasales de monos expuestos por 90 días se observaron cambios

ultraestructurales en las células secretorias lo cual no es característico de una respuesta aguda, pues éstas no se observaron en los expuestos por 6 días (16).

Esto también puede sugerir una respuesta del epitelio nasal donde las células epiteliales son reemplazadas por otras más resistentes (18).

Se ha sugerido que aparte del efecto tóxico del O_3 en el epitelio los polimorfonucleares pueden liberar productos capaces de inducir hiperplasia secretoria (13) y en el presente estudio se observó infiltrado inflamatorio constituido por polimorfonucleares en la mayoría de los perros expuestos.

En cambio la metaplasia de células escamosas sí fué un cambio significativo. En 9 de los 10 perros expuestos presentaron algún grado de metaplasia escamosa; similar respuesta se ha observado en humanos expuestos por más de 60 días al ambiente de la ciudad de México (5), en ratones expuestos por más de 45 días a O_3 (28) en pulmones de perro en la ciudad de México (11) y en perros expuestos durante 18 meses también a O_3 (34).

Esto sugiere que la metaplasia escamosa es resultado de un período prolongado de exposición y también puede

considerarse un mecanismo inespecifico de defensa donde el epitelio respiratorio normal es reemplazado por un epitelio estratificado menos vulnerable a tóxicos (32).

Así mismo la inflamación fue un cambio significativo y en la mayoría de los casos expuestos se observó infiltrado inflamatorio (polimorfonucleares), la presencia de células inflamatorias se ha observado en abundancia en biopsias nasales de habitantes de la ciudad de México (6,7,8), así como en monos expuestos a O₃ (16) y en pulmones de perros en la ciudad de México (11).

Debido a que niveles superiores a 0.12 ppm de O₃ pueden producir una respuesta inflamatoria y como en la ciudad de México estos niveles son constantes la cantidad de polimorfonucleares también se mantiene constantemente alta y no puede disminuir (8), así en el lavado bronquioloalveolar de perros en la zona suroeste de la ciudad de México se observó mayor cantidad de neutrófilos y linfocitos lo cual fué diferente a lo observado en perros de otras zonas de la ciudad de México (36).

Se ha observado que sustancias aldehídicas producidas por la degradación del ácido araquidónico por O₃ pueden

intervenir en la migración de polimorfonucleares como se ha observado en roedores y humanos expuestos a O_3 (23).

Estas células al ser estimuladas producen metabolitos del oxígeno y aminos halogenadas fuertemente oxidantes (36) así como ácido araquidónico libre y productos de su degradación (10) que interactúan con los componentes de las membranas celulares así como con el ADN y los cromosomas (37). Además las células inflamatorias pueden producir sustancias capaces de inducir hiperplasia y metaplasia secretoria (13). Por lo que la presencia de estas células proporciona las condiciones adecuadas para el desarrollo de hiperplasia, metaplasia, displasias (8) y neoplasias (10,31,33,37).

En el SOCM el O_3 es el principal contaminante, mientras que otros como el dióxido de azufre, el dióxido de nitrógeno y partículas totales suspendidas se encuentran debajo de las normas establecidas o son indetectables pero quizás pueden interactuar con el O_3 (7) pues es difícil atribuir patologías específicas a un contaminante en especial (21) además de que solo unos cuantos efectos adversos han sido identificados como resultado de la exposición a un contaminante en especial (30).

En este estudio se consideró específicamente al O_3 por ser el componente principal del smog fotoquímico y ser una molécula extremadamente reactiva que afecta a un gran número de sistemas biológicos y que interactúa con los componentes celulares (25) del cual se han incrementado notablemente sus niveles en la ciudad de México desde 1987 debido al uso de nuevas gasolinas (4,17). El cual es capaz de producir efectos respiratorios agudos o crónicos aún en ausencia de otros contaminantes (24) cuyo rango de captación en el epitelio nasal del perro es del 80 al 87% (39).

Es importante considerar que una sola exposición a O_3 produce respuestas biológicas medibles y que un día con altos niveles de éste gas muy probablemente será seguido por otros más, por lo que los efectos de éste se acumulan o progresan a lo largo de continuas exposiciones; y repetitivas exposiciones producen una adaptación funcional pero el daño tisular es progresivo (22).

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el O_3 puede afectar al sistema inmune; tales alteraciones incluyen disminución en la actividad de las células inflamatorias para inactivar bacterias, disminución en la actividad de macrófagos, alteraciones en su motilidad,

fragilidad de sus membranas y reducción en la actividad de enzimas lisosomales (22).

Además productos de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados como el malonaldehído proveniente de la degradación oxidativa del ácido araquidónico interfieren con la migración de polimorfonucleares, disminuyen la mitosis de linfocitos T y disminuyen la actividad de las células killer (23).

Por ejemplo en ratones expuestos por 120 días a 2.5 ppm de O₃ se observó una mayor susceptibilidad a sufrir infección por *Mycoplasma* lo que coincide con lo observado por varios autores que han demostrado un incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales (23).

Se ha reportado que el perro es una especie resistente al daño producido por el O₃, sin embargo los resultados de este estudio sugieren que el epitelio respiratorio nasal de perros también presenta cambios como pérdida de cilios y principalmente cambios adaptativos como hiperplasia secretoria y metaplasia escamosa así como una respuesta inflamatoria aguda como resultado de la exposición prolongada a la atmósfera contaminada del SOCM.

El daño al aparato mucociliar nasal con alteración en la producción de moco y en la fisiología nasal se traduce en alteraciones en el resto del aparato respiratorio predisponiéndolo así a enfermedades infecciosas debido a que los productos de la degradación oxidativa afectan la actividad de las células fagocíticas.

También puede favorecer la presentación de enfermedades neoplásicas en algunas especies debido tanto a la producción de compuestos fuertemente oxidantes a partir de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados por contaminantes como el O_3 , como a las sustancias oxidantes liberadas por las células inflamatorias; que causan alteraciones en el ADN sin llevar a la muerte celular; así como por las alteraciones producidas en el sistema inmune.

Esas células sobrevivientes pueden presentar mutaciones y sufrir transformación hacia células malignas.

Así el daño al ADN puede ser el punto de unión entre un proceso inflamatorio crónico y la formación de neoplasias.

El acortamiento de cilios, la hiperplasia secretoria, la metaplasia escamosa y la inflamación son cambios que posiblemente pueden ser causados por la exposición a una atmósfera altamente contaminada con altos niveles de O_3 ; sin

embargo, para apoyar lo anterior es necesaria la realización de proyectos con variables más controladas y mejor metodología, por lo que el presente estudio es una base para estudios posteriores.

Literatura citada.

1. Balchun, O.J., O'Brien, J.S. and Goldstein, B.D.: Ozone and unsaturated fatty acids. *Arch. Environ. Health*. 22: 32-34 (1971).
2. Blake, D.R. and Sherwood, R.F.: Urban leakage of liquefied petroleum gas and its impact on México City air quality. *Science*. 269: 953-955 (1995).
3. Boatman, E.S., Sato, S. and Frank, R.: Acute effects of ozone on cat lungs. *Am. Rev. Resp. Dis.* 110: 157-169 (1974).
4. Bravo, A.H., Roy-Ocotla, R.G., Sánchez, A.P. y Torres, J.R.: Contaminación atmosférica por ozono en la zona suroeste de la ciudad de México: Evolución histórica y perspectivas. *OMNIA*. 23: 39-47 (1991).
5. Calderon-Garcidueñas, L., Osorno-Velázquez, A., Bravo-Alvarez, H., Delgado-Chavez, R. and Barrios-Marquez, R.: Histopatologic changes of the nasal mucosa in southwest metropolitan Mexico City inhabitants. *Am. J. Pathol.* 140: 225-232 (1992).
6. Calderon-Garcidueñas, L., Rodríguez-Alcaraz, A., García, R., Ramírez, L. and Barragan, G.: Nasal inflammatory responses in children exposed to a polluted urban atmosphere. *J. Toxicol. Environ. Health* 45: 427-437 (1995).

7. Calderon-Garcidueñas, L., Rodriguez-Alcaraz, A., Garcia, R., Sanchez, G., Barragan, G., Camacho, R. A and Ramirez, L.: Human nasal mucosa changes after exposure to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* 102: 1074-1080 (1994).
8. Calderon-Garcidueñas, L. and Roy-Ocotla, G.: Nasal cytology in the southwest metropolitan Mexico City inhabitants: a pilot intervention study. *Environ. Health Perspect.* 101: 138-144 (1993).
9. Carson, J.L., Collier, A.M., Henshaw, N.G., Smith, C.A. and Shin-Chin H.: Response of the human ciliated respiratory epithelium to brief in vivo ozone exposure: an ultrastructural study. *Environ. Res.* 37: 212-227 (1985).
10. Cerutti, A.P.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* 227: 375-381 (1985).
11. De Buen de Argüero, N. y Castillo, G.: Citología bronquial del perro. *Vet. Mex.* 9: 169-181 (1978).
12. Egle, J.L. and Va, R.: Retention of inhaled acetaldehyde in dog. *Arch. Environ. Health* 24: 354-357 (1972).
13. Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A., Harmsen, A.G. and Henderson, R.F.: In vivo effects of transient neutrophil

influx on nasal respiratory epithelial mucosubstances. *Am. J. Pathol.* 130: 605-615 (1988).

14. Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A. and Henderson, R.F.: Effects of 0.12 and 0.80 ppm of ozone on rat nasal and nasopharyngeal epithelial mucosubstances: quantitative histochemistry. *Toxicol Pathol.* 17: 525-535 (1989).

15. Harkema, J.R., Mariassy, A., St. George, J., Hyde, D.M. and Plopper, C.G.: epithelial cells of the conducting airways. A species comparison. *The Airway Epithelium* (S.G. Farmer and D. W. P. Hay eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 3-39, 1991.

16. Harkema, J. R., Plopper, C.G., Hyde, D.M., St. George, J.A., Wilson, D.W. and Dungworth, D.L.: Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. *Am. J. Pathol.* 128: 29-44 (1987).

17. Herrera, H.M., García, G.A. y Bravo, A.H.: Concentraciones de ozono en Ciudad Universitaria relacionadas con cambios en la gasolina vendida en la Ciudad de México. Un análisis estadístico. *OMNIA* 23: 49-57 (1991).

18. Hotchkiss, J.A., Harkema, J.R. and Henderson, R.F.: Effect of cumulative ozone exposure on ozone-induced nasal

epithelial hyperplasia and secretory metaplasia in rats.

Exp. Lung Res. 15: 589-600 (1991).

19. Jaffe, L.S.: Photochemical air pollutants and their effects on men and animals. *Arch. Environ. Health* 16: 241-255 (1968).

20. Johnson, N.F., Hotchkiss, J.A., Harkema, J.R. and Henderson, R.F.: Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103: 143-155 (1990).

21. Lemos, M., Lichtenfels, A.J.F., Amaro, E., Macchione, M., Martins, M.A., King, M., Böhm, G.M. and Saldiva, P.H.N.: Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban level of air pollution. *Environ. Res.* 66: 87-95 (1994).

22. Lippman, M.: Health effects of ozone. A critical review. *JAPCA* 39: 672-695 (1989).

23. Madden, M.C., Friedman, M., Hanley, N., Siegler, E., Quay, J., Becker, S., Devlin, R. And Koren, H.S.: Chemical nature and immunotoxicological properties of arachidonic acid degradation products formed by exposure to ozone. *Environ. Health Perspect.* 101: 154-164 (1993).

24. McDonnell, W.F., Zenick, H. and Hayes, C.G.: U.S. Environmental Protection Agency's Ozone Epidemiology Research Program: A strategy for assessing the effects of ambient ozone exposure upon morbidity in exposed populations. *Air & Waste* 43: 950-954 (1993).
25. Mehlman, M.A. and Borek, C.: Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ. Res.* 42: 36-53 (1987).
26. Miller, F.J., McNeal, C.A., Kirtz, J.M., Gardner, D.E., Coffin, D.L. and Menzel, D.B.: Nasopharyngeal removal of ozone in rabbits and guinea pigs. *Toxicology* 14: 273-281 (1979).
27. Morgan, K.T. and Monticello, T.M.: Airflow gas deposition and lesion distribution in the nasal passages. *Environ. Health Perspect.* 88: 209-218 (1990).
28. Penha, P.D. and Werthamer, S.: Pulmonary lesions induced by long-term exposure to ozone. *Arch. Environ. Health* 29: 282-289 (1974).
29. Plopper, C.G., Duan, X., Buckpitt, A.R. and Pinkerton, K.E.: Dose-dependent tolerance to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 124-131 (1994).

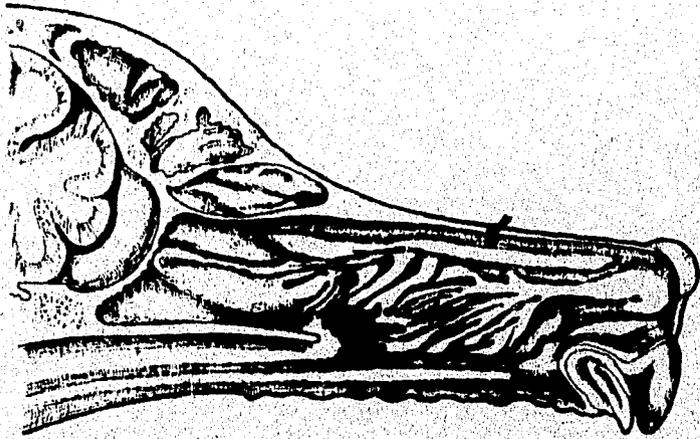
30. Samet, J.M. and Speizer, F.E.: Assessment of health effects in epidemiologic studies of air pollution. *Environ. Health. Perspect. Suppl.* 101: 149-154 (1993).
31. Schraufstatter, I., Hyslop, P.A., Jackson, J.H. and Cochrane, C.G.: Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J. Clin. Invest.* 82: 1040-1050 (1988).
32. Spicer, S.S., Chakrin, L.W. and Wardel, J.R.: Effect of chronic sulfur dioxide inhalation on carbohydrate histochemistry and histology of the respiratory canine tract. *Am. Rev. Resp. Dis.* 110: 13-24 (1974).
33. Steinberg, J.J., Gleeson, J.L. and Gil, D.: The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch. Environ. Health* 45: 80-87 (1990).
34. Stephens, R.J., Freeman, G., Stara, J.F. and Coffin, D.L.: Cytologic changes in dog lungs induced by chronic exposure to ozone. *Am. J. Pathol.* 73: 711-726 (1973).
35. Tilton, B.E.: Health effects of tropospheric ozone. *Environ. Sci. Technol.* 23: 257-263 (1989).
36. Vanda, C.B.: Cuerpos ferruginosos y celularidad en el lavado bronquioloalveolar en perros de la ciudad de México y una zona rural. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y

Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1995).

37. Weitzman, S.A., Weitberg, A.B., Clark, E.P. and Stossel, T.P.: Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227: 1231-1233 (1985).

38. Wilson, D.W., Plopper, C.G. and Dungworth, D.L.: The response of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. A quantitative ultrastructural and autoradiographic study. *Am. J. Pathol.* 116: 193-206 (1984).

39. Yokoyama, E. And Frank, R.: Respiratory uptake of ozone in dogs. *Arch. Environ. Health* 25: 132-138 (1972).



¹ Figura 1. Corte longitudinal de cabeza de perro mostrando el área de toma de biopsias dentro de la cavidad nasal.



Figura 2. Micrografía fotónica de epitelio pseudoestratificado ciliado normal con células caliciformes (Azul de toluidina x 800).

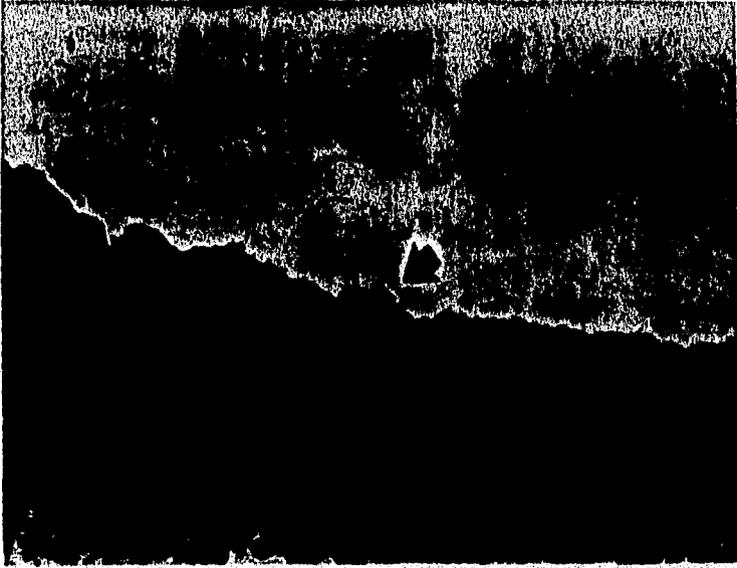


Figura 3. Micrografía fotónica de epitelio pseudoestratificado de un perro expuesto a la atmósfera del SOCM con pérdida severa de cilios (Azul de toluidina x800).

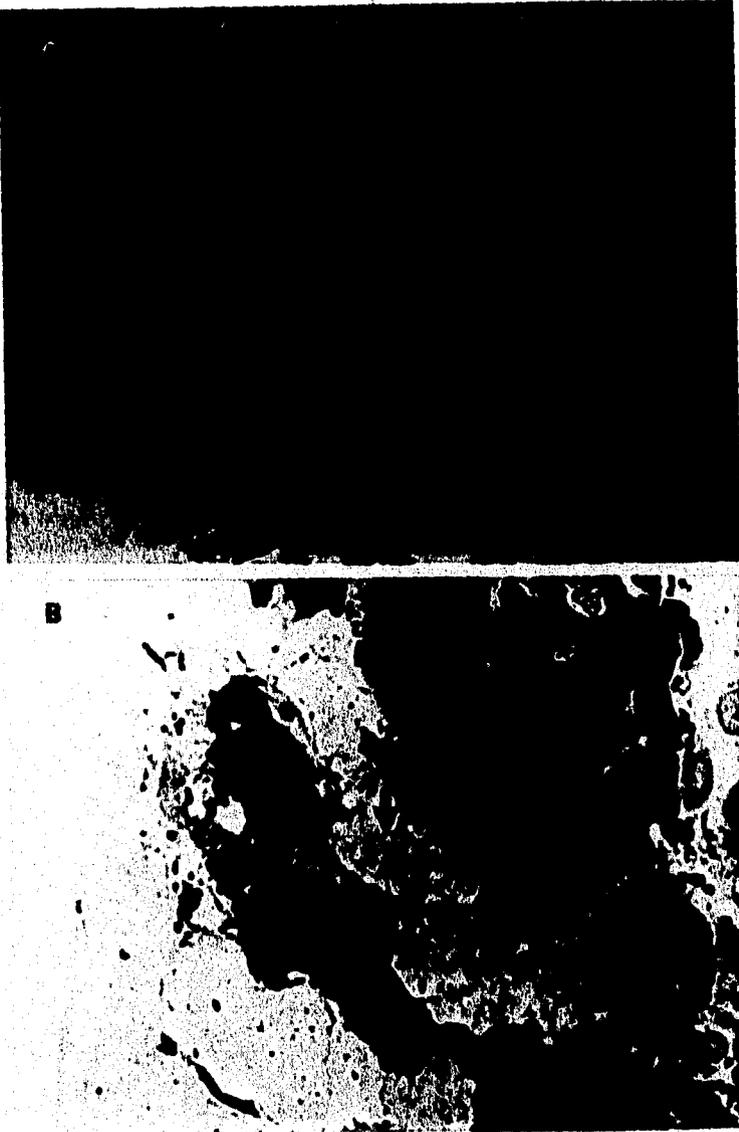
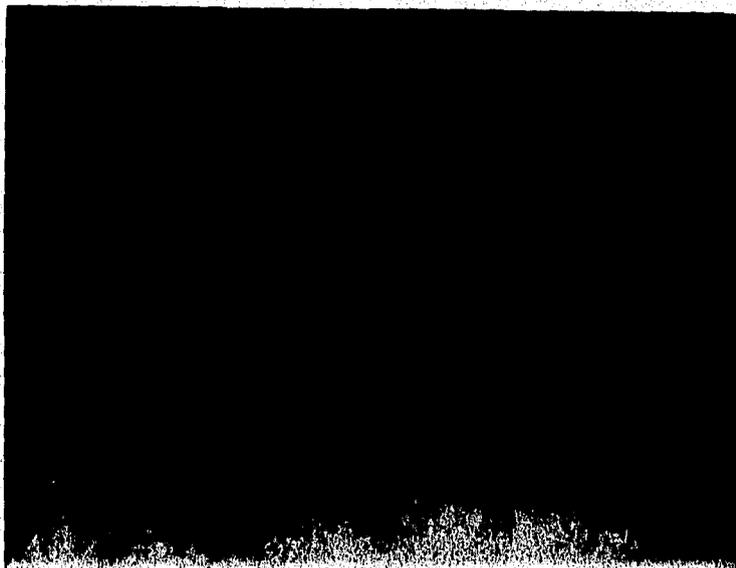


Figura 4. a) Epitelio pseudoestratificado ciliado de un perro expuesto donde con hiperplasia e hipertrofia de células calciformes (Azul de toluidina x 800). b) Acumulación de moco en la superficie epitelial (flecha) (Azul de toluidina x 800).



⁵ Figura 5. Micrografía fotónica de epitelio metaplásico escamoso de un perro expuesto en el que se encuentran células caliciformes entremezcladas (Flecha) (Azul de toluidina x 800).



⁶ Figura 6. Micrografía fotónica que muestra infiltrado inflamatorio agudo compuesto por polimorfonucleares (flecha) en el epitelio respiratorio nasal de un perro expuesto que además presentó pérdida severa de cilios y algunas células degeneradas (Azul de toluidina x 800).

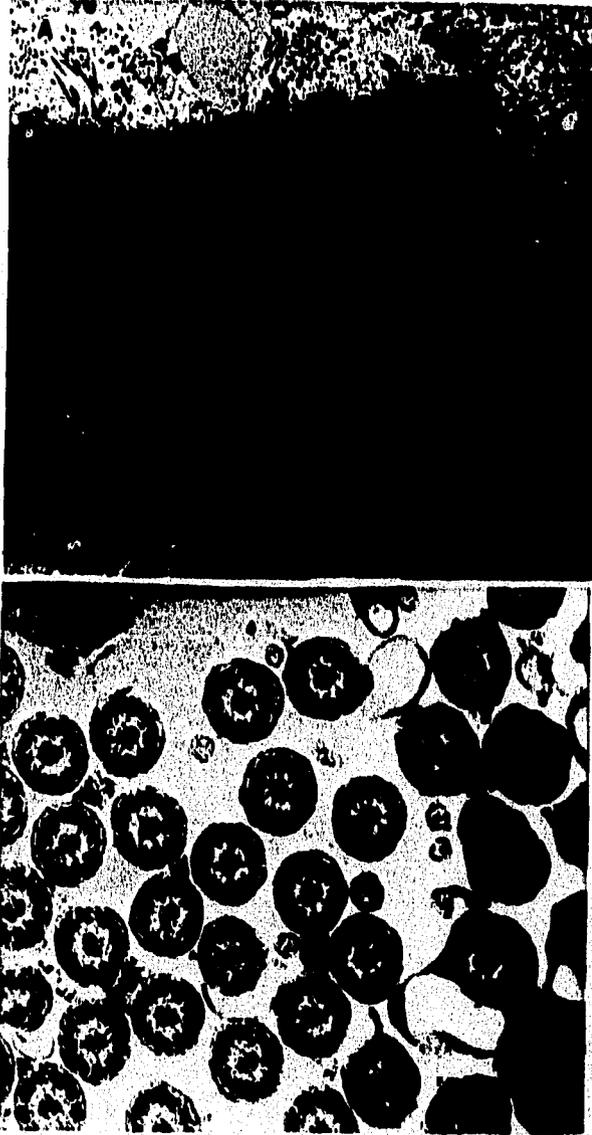


Figura 7. a) Micrografía electrónica de transmisión de una biopsia de perro control mostrando la ultraestructura normal de las células ciliadas y las células caliciformes (x 3,000). b) Detalle de la estructura ciliar que muestra los nueve pares de túbulos alrededor de un par central (x 30,000).

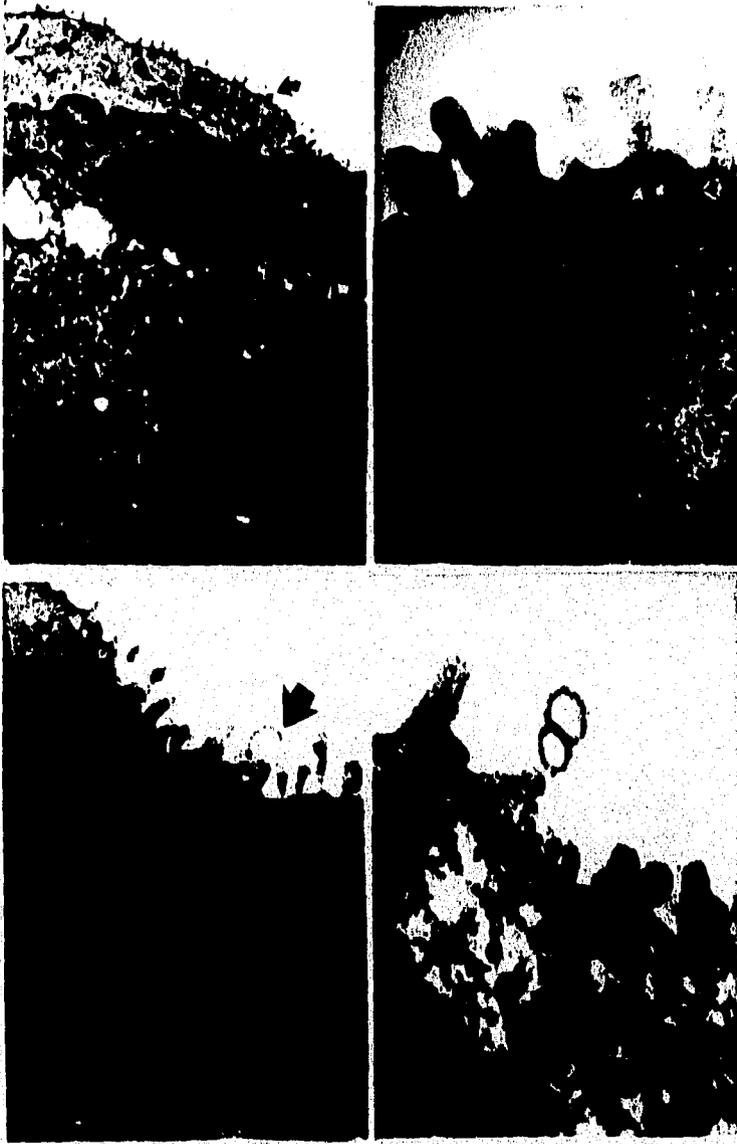


Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de un caso expuesto que muestra: a-b) células ciliadas aplanadas con cilios cortos (flecha) (x 4,400 y x 20,000) y c-d) cilios cortos con vesículas (flecha) (x 7,000 y x 20,000).



¹⁰ Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de una célula necrótica y células con cilios cortos en el epitelio nasal de un perro expuesto (x 4,400).



¹¹ Figura 10. a) Micrografía electrónica de transmisión que muestra epitelio metaplásico escamoso (x 4,400). b) Célula escamosa metaplásica con desproporción en el tamaño núcleo-citoplasma y escotaduras en la membrana nuclear (x 12,000).



¹⁴ Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión que muestra una célula caliciforme nasal de un perro expuesto con dilatación del aparato de Golgi y abundantes vesículas de moco de diferente tamaño y con sus membranas fusionadas (x 12,000).

ESTA TESIS NO DEBE
VENDRSE EN LA BIBLIOTECA

COMPARACION ENTRE EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPUESTO SEGUN LA PRUEBA ESTADISTICA DE "T" CONSIDERANDO UNA $p < 0.05$, EN LA QUE SE OBSERVA QUE LA METAPLASIA ESCAMOSA Y LA INFLAMACION SON CAMBIOS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS.

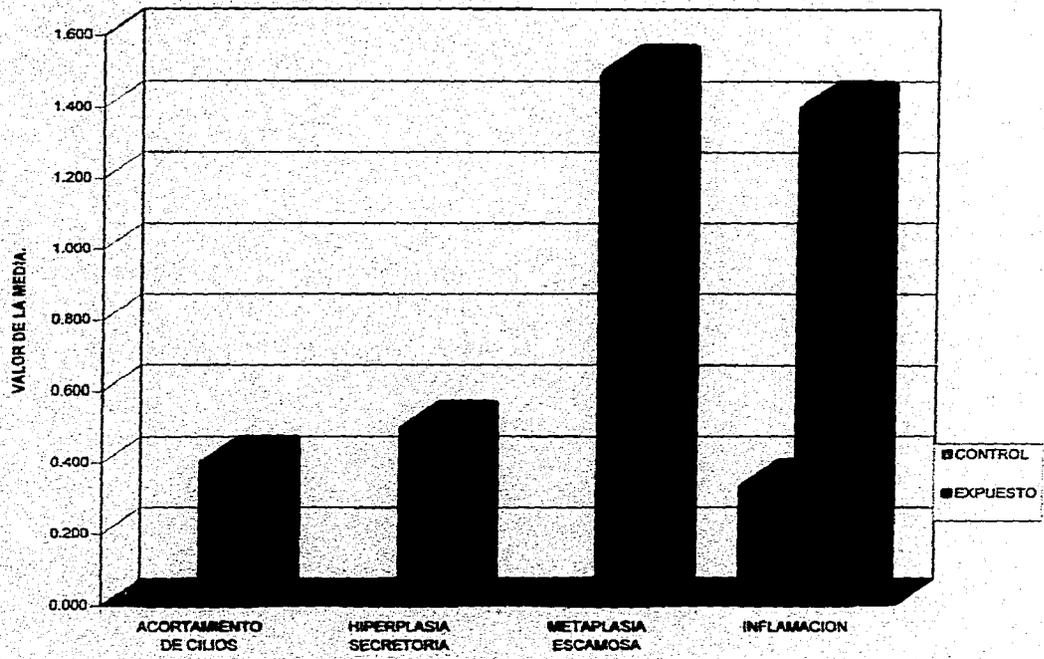


Figura 12

CUADRO 1.

AÑO.	HORAS DE EXCEDENCIA DE OZONO AL AÑO.	PROMEDIO DE HORAS AL DÍA.
1987	740	2.02
1988	959	2.62
1989	1224	3.35
1990	1403	3.84
1991	1561	4.27
1992	1395	3.82
1993	1146	3.14
1994	1065	2.91

CUADRO 2.

DIA.	NUMERO DE HORAS > 0.11 ppm O ₂ .	VALOR MÁXIMO [O ₂].	HORA PICO.
17 Julio	4	0.165	12
18 Julio	1	0.119	13
19 Julio	0	-	-
20 Julio	3	0.143	14
21 Julio	5	0.266	15
22 Julio	4	0.190	14
23 Julio	5	0.164	14
24 Julio	0	-	-
25 Julio	4	0.176	15
26 Julio	0	-	-
27 Julio	5	0.236	14
28 Julio	3	0.155	13
29 Julio	4	0.194	14
30 Julio	4	0.196	15
31 Julio	6	0.349	13
1 Agosto	5	0.195	14
2 Agosto	5	0.274	15
3 Agosto	6	0.263	14
4 Agosto	5	0.197	14
5 Agosto	3	0.146	14

CUADRO 3.

NUMERO DE CASO	EDAD	SEXO	RAZA	PESO(kg)	LOCALIDAD.	TIEMPO DE RESIDENCIA
1 C	1 Año	Hembra	Criollo	8	Veracruz	1 Año
2 C	4 Años	Hembra	Maltés	4	Veracruz	4 Años
3 C	4 Años	Macho	F.Poodle	4	Veracruz	2 Años
1 E	6 Meses	Hembra	Samoyedo	15	Tlalpan D.F.	3 Meses
2 E	9 Meses	Macho	Maltés	10	Tlalpan D.F.	9 Meses
3 E	2 Años	Hembra	Maltés	7	Tlalpan D.F.	2 Años
4 E	2 Años	Macho	Boxer	15	Tlalpan D.F.	2 Años
5 E	2 Años	Hembra	Weimaraner	15	Tlalpan D.F.	2 Años
6 E	2 Años	Hembra	P. Alemán	20	Tlalpan D.F.	2 Años
7 E	4 Años	Macho	F. Poodle	4	Tlalpan D.F.	4 Años
8 E	5 Años	Macho	Criollo	5	Tlalpan D.F.	2 Años
9 E	5 Años	Macho	Husky s.	25	Tlalpan D.F.	5 Años
10 E	5 Años	Macho	P. Alemán	25	Tlalpan D.F.	5 Años

C:Control.

E:Expuesto.

CUADRO 4.

NÚMERO DE CASO.	ACORTAMIENTO DE CILIOS.	HIPERPLASIA SECRETORIA.	METAPLASIA ESCAMOSA.	INFILTRADO INFLAMATORIO.
1 C	-	-	-	-
2 C	-	-	-	+
3 C	-	-	-	-
1 E	-	-	+	+
2 E	A	-	+++	+
3 E	-	+++	+	+
4 E	-	-	+	+
5 E	-	+	+	-
6 E	+	-	++	+
7 E	+++	-	-	+++
8 E	-	+	+	+
9 E	-	-	++	++
10 E	A	-	+++	+++

C: Control

E: Expuesto

A: Ausentes