

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

12

EXPOSICION CRONICA A OZONO E HIPERREACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS, EVALUACION DE LA INFLAMACION Y LA TOLERANCIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

270039

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS (PATOLOGIA)

P R E S E N T A : MVZ LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO

ASESOR: MVZ DR. LUIS M. MONTAÑO RAMIREZ

COASESORA: MVZ M. en C. NURIA DE BUEN DE ARGÜERO



MEXICO, D. F.

2000



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.

a TODOS
y cuando digo a todos, esos *todos*, saben que están incluidos...
pero sobre todo, a los COBAYOS

AGRADECIMIENTOS.

A CONACyT, por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de maestría.

A la Facultad de Veterinaria de la UNAM, por el apoyo económico para realizar esta investigación.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por el uso de sus instalaciones y de su material.

Al Dr. Luis Montaña, por su enorme disposición para asesorarme, por el tiempo que dedicó a este proyecto y por su paciencia. ¡ Más vale tarde que nunca!

Al Dr. Mario Vargas, por el tiempo invertido en este trabajo y por sus valiosas observaciones.

A la Dra. Nuria de Buen, por su confianza, por su tiempo, por su empeño en mi desempeño... ¡Gracias!

A todos y cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Asma, por su ayuda, por su apoyo, por su tiempo, por su complicidad... Especialmente a Blanca por la "alineación", "la impresión" y por su amistad. ¡Mil gracias!

A Bety Vanda, por su colaboración en la revisión de la microscopía, y por todas las porras...

A Pitis y a Andrea, por su amistad incondicional y por estar a mi lado siempre que las necesito.

A Luis, Camila, Santiago, Teodoro y Pascal, porque son el motor de mi vida...

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Ozono.....	4
Efectos tóxicos del ozono.....	5
Hiperreactividad.....	7
Inflamación.....	8
Alteraciones morfológicas.....	9
Tolerancia.....	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Exposición a ozono.....	14
Experimentos <i>in vivo</i>	14
Lavado broncoalveolar.....	15
Quimiotaxis.....	16
Determinación de superóxido dismutasa.....	17
Estudio histopatológico.....	18
Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS	20
CUADROS Y FIGURAS	23
Fig.A Ciclo fotolítico del NO ₂	23
Fig.B Interacción de los NMHC con el ciclo fotolítico del NO ₂	24
Fig.C Equivalencia de los IMECAs con las ppm de O ₃	25
Cuadro 1. Efecto de la exposición a O ₃ sin la administración de SP.....	26
Fig.1 Registro original de la presión de insuflación pulmonar.....	27
Fig.2 Efecto de la exposición a O ₃ en la reactividad de las vías aéreas.....	28
Fig.3 Cambios en la cuenta celular del LBA.....	29
Fig.4 Correlación entre la reactividad aérea y la cuenta celular.....	30
Fig.5 Factores quimiotácticos.....	31
Fig.6 Concentración de superóxido dismutasa.....	32
Fig.7 Estudio histopatológico.....	33
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	39
LITERATURA CITADA.....	40

RESUMEN

ROMERO ROMERO, LAURA PATRICIA. Exposición Crónica a Ozono e Hiperreactividad de las Vías Aéreas. Evaluación de la Inflamación y la Tolerancia en un Modelo Experimental (bajo la dirección de Luis M. Montañó Ramírez y Nuria de Buen de Argüero).

El ozono (O_3) es un contaminante secundario formado en la atmósfera a partir de los contaminantes primarios. La inhalación de O_3 por arriba de los límites permisibles (0.11 ppm) produce alteraciones en las vías aéreas, entre las que sobresale la hiperreactividad. El desarrollo de tolerancia al daño producido por exposiciones crónicas a O_3 involucra cambios en el epitelio respiratorio, así como tolerancia a las pruebas funcionales, sin embargo son muy escasos los trabajos que se han llevado a cabo para estudiar el fenómeno de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas. Se ha observado que la exposición aguda a bajas concentraciones de O_3 (0.3 ppm) es capaz de producir hiperreactividad a la sustancia P (SP). El propósito de este trabajo fue evaluar el posible desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas con exposiciones repetidas a O_3 , y la participación de la inflamación en este fenómeno. Se realizaron curvas no acumulativas dosis-respuesta con SP en dosis crecientes de 0.0056 a 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. en cobayos machos, 16 a 18 h después de la exposición a aire filtrado o a O_3 (0.3 ppm, por un período de 4 h, durante 1, 3, 6, 12, 24 ó 48 días seguidos). La respuesta bronquial al agonista constrictor se evaluó como el incremento de la presión de insuflación pulmonar y se expresó como el $-\log DE_{50}$. Se observó que la exposición a 0.3 ppm de O_3 , concentración que con frecuencia se alcanza en la atmósfera de la Cd. de México, incrementó la reactividad de las vías aéreas a la SP ($p < 0.05$) en casi todos los grupos estudiados, desde 1 día hasta los 24 días de exposición. El $-\log DE_{50}$ para 1, 3, 6, 12 y 24 días de exposición (3.62 ± 0.048 , 3.63 ± 0.055 , 3.92 ± 0.046 , 3.62 ± 0.037 y 3.78 ± 0.069) fue estadísticamente diferente ($p < 0.01$) comparado con el grupo control (3.20 ± 0.053). Sin embargo, a los 48 días de exposición a O_3 la reactividad de las vías aéreas regresó a un valor semejante (3.33 ± 0.046) al del grupo control expuesto a aire filtrado, lo cual sugiere que la exposición crónica a O_3 , después de 48 días, induce al desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas a la SP en cobayos. Se realizó un lavado broncoalveolar (LBA), en el que se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en la cuenta celular total en todos los grupos experimentales expuestos a O_3 , así como en el número de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, mas no así en la cuenta de linfocitos, los cuales se incrementaron únicamente en los grupos de 24 y 48 días de exposición a O_3 . Se realizaron también pruebas de migración para neutrófilos y eosinófilos para evaluar la actividad quimiotáctica en el líquido del LBA, en las cuales se observó migración neutrofílica únicamente, y sólo en los grupos de 3, 6, 12, 24 y 48 días de exposición. Por último, se practicaron estudios de microscopia de luz de cortes de las vías aéreas, en los que lo más relevante fue la presencia de infiltrado inflamatorio constituido predominantemente por macrófagos, asimismo se encontró metaplasia epitelial, con una tendencia a desarrollarse en los animales con períodos de exposición más prolongados (12, 24 y 48 días). Todos estos hallazgos indican que las vías aéreas sufren un proceso de adaptación a las exposiciones repetidas a O_3 .

ABSTRACT

ROMERO ROMERO, LAURA PATRICIA. Chronic Exposure to Ozone and Airway Hyperresponsiveness. Evaluation of Inflammation and Tolerance in an Experimental Model (directed by Luis M. Montaña Ramírez and Nuria de Buen de Argüero).

Ozone (O₃) is a secondary pollutant generated in the atmosphere by a complex serie of photochemical reactions from primary pollutants. The hazardous effects of O₃ on health have been well studied in animals and humans. Since the pollution originated by this gas has reacently been highly increased, further research on its consequences becomes an interesting aim of study. Exposure to O₃ concentrations above the established limits (0.11 ppm) produces changes in the airways, mainly airway hiperresponsiveness. Tolerance development after chronic exposures to O₃ involves airway epithelial changes that include alterations in the secretory activity as well as in the cellular composition. It has also been demonstrated that O₃ at low levels produces tolerance to functional tests, but not to airway hiperresponsiveness. The aim of this work was to study the tolerance development to airway hiperresponsiveness to substance P (SP) after repeated exposures to O₃. Male guinea-pigs exposed to air or O₃ (0.3 ppm for 4 h daily during 1, 3, 6, 12, 24 or 48 days) were studied 16-18 h after the last exposure; non-accumulative dose-response curves to SP were done (0.0056 to 3.2 µg/kg, IV). The bronchial responsiveness to the agonist was evaluated as the increase in the pulmonary insufflation pressure and expressed as the -log ED₅₀. O₃ exposure at concentrations frecuently observed in Mexico City's atmosphere augmented the airway responsiveness to SP in almost all the studied groups, since the 1st day until the 24th day of exposure. The -log ED₅₀ for the 1, 3, 6, 12, 24 days of exposure groups (3.62±.048, 3.63±.055, 3.92±.046, 3.62±.037 and 3.78±.069) was statistically different (p<0.01) compared with the control group (3.20±.053). However, at 48 days of O₃ exposure the airway responsiveness returns to a value (3.33±.046) similar to the control group exposed to air. This results suggests that chronic exposure to O₃, after 48 days of exposure, induces the development of tolerance to SP airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. A bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in every animal studied, an important increase in the total cell count (p<0.01) was observed in all of the guinea pigs exposed to O₃. The macrophage, neutrophil and eosinophil counts were also increased, but not the lymphocitic count. The latest increased only in the 24 and 48 days groups. To evaluate the chemotactic activity in the BAL fluid, migration tests for neutrophils and eosinophils were done. Only neutrophilic migration was found in the 3, 6, 12, 24 and 48 days groups of O₃ exposure. Finally, light microscopy was performed to the airway tissue, and inflammatory infiltration, predominantly by macrophages, was observed, as well as epithelial metaplasia in the longer exposed groups (12, 24 and 48 days). All this findings indicate that respiratory airways develop an adaptation process to repeated O₃ exposure.

ABREVIATURAS

DE	Dosis Efectiva
g	Gravedades
GM-CSF	Factor de estimulación de crecimiento de colonias de macrófagos
IL	Interleucina
IMECA	Índice Metropolitano de Calidad del Aire
Kg	Kilogramo
Km	Kilómetro
LBA	Lavado broncoalvelar
LT	Leucotrieno
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micras
mg	Miligramos
ml	Mililitros
NANC	Sistema de inervación no-adrenérgico no-colinérgico
NEP	Endopeptidasa neutra
NMHC	Hidrocarburos reactivos
NOx	Oxidos de nitrógeno
O	Oxígeno atómico
O ₂	Oxígeno
O ₃	Ozono
PAF	Factor de activación plaquetaria
PG	Prostaglandina
ppm	Partes por millón
RTLf	Fluido de recubrimiento del tracto respiratorio
SP	Sustancia P
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TX	Tromboxano

INTRODUCCIÓN

Ozono

El ozono (O_3) es una forma alótopa reactiva del oxígeno y es reconocido como uno de los principales oxidantes de origen fotoquímico de la atmósfera. Es un componente normal del aire que se encuentra en concentraciones altas (10 ppm) en la estratósfera, masa de aire situada entre 15-50 km de la superficie terrestre, en la que los gases se encuentran casi en reposo (1). Ahí se sitúa el 90% del O_3 de nuestra atmósfera, que se forma a través de reacciones cíclicas resultado de la fotólisis del oxígeno en oxígeno atómico y la subsecuente reacción del oxígeno atómico con otras moléculas de oxígeno, formando una capa que absorbe la radiación solar ultravioleta, que de incidir directamente sobre la tierra, dañaría severamente a todas las formas de vida (2). En la tropósfera, capa que está en íntimo contacto con la tierra, la presencia de O_3 es normal en muy bajas concentraciones (cerca de 0.06 ppm), cuando ésta se incrementa, se le considera como un contaminante (3).

El O_3 es un contaminante secundario antropogénico producido en la tropósfera a través de una compleja serie de reacciones químicas dependientes de la radiación solar a partir de los contaminantes primarios o precursores, como los óxidos de nitrógeno (NO_x) e hidrocarburos reactivos (NMHC) (4). Las fuentes de emisión de estos precursores son principalmente los vehículos motores de combustión y en forma secundaria los procesos industriales y los expendios de gasolina. Uno de los precursores, el bióxido de nitrógeno (NO_2), absorbe en forma muy eficiente la radiación ultravioleta que incide sobre la superficie de la tierra, iniciando un ciclo químico en el que la molécula de NO_2 se divide en NO y O^* , este último al combinarse con el oxígeno (O_2) forma O_3 . Bajo condiciones normales, el O_3 y los NO_x se vuelven a combinar en la misma proporción en que se producen, estableciendo un estado de equilibrio en las concentraciones de O_3 , O_2 , NO_2 y NO (Fig. A). El ingreso de compuestos orgánicos a la atmósfera trastorna este equilibrio

y permite la acumulación de altos niveles de O_3 . Al combinarse más fácilmente los NMHC con el oxígeno atómico (O) que con el O_3 , cierran el ciclo fotolítico sin que se consuma O_3 , provocando que este gas se mantenga en la atmósfera y se incremente su concentración (5) (Fig. B).

Debido a la naturaleza tóxica del O_3 , en muchos países los niveles ambientales están sujetos a una regulación gubernamental. Se ha establecido, con base en estudios epidemiológicos y experimentales, que la concentración máxima de exposición a la que puede estar sujeto el hombre es de $235 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.12 ppm), valor promedio por hora que no debe excederse más de una vez por año (6). En México, se ha implantado un criterio de evaluación para los niveles de contaminantes, el cual tiene como objeto establecer un marco de referencia para la protección de la salud de la población y del ambiente. Este criterio es definido como Índice Metropolitano de Calidad del Aire (IMECA) y se le asigna una escala de 0 a 500, siendo 100 puntos el valor máximo permitido para cada contaminante. En el caso del O_3 el valor 100 IMECAs corresponde a 0.11 ppm ó $216 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (7) (Fig. C).

Hasta hace algunos años, las concentraciones de ozono en la Ciudad de México superaban con frecuencia el máximo permisible, alcanzándose concentraciones de hasta 0.4 ppm (8). Se ha demostrado que un aumento en la concentración de O_3 por arriba de los límites permisibles, es capaz de producir efectos tóxicos sobre la salud, tanto en el hombre como en los animales (1).

Efectos Tóxicos del Ozono

Durante la inhalación de O_3 , las vías aéreas constituyen la primera barrera tisular expuesta a sus efectos dañinos y en ellas es capaz de desencadenar alteraciones bioquímicas, morfológicas y funcionales (9, 10). Los efectos tóxicos del O_3 sobre los seres vivos son atribuidos a su potencial oxidativo, es decir, a su capacidad de remover electrones de otras moléculas o iones (11). Las células epiteliales del pulmón son el principal blanco de los contaminantes aéreos, estos tóxicos inducen

daño oxidativo en las células epiteliales, especialmente las localizadas en la unión del bronquiolo con el ducto alveolar (12).

La primera línea de defensa contra la inhalación de gases tóxicos como SO_2 , NO_2 , humo de cigarro y O_3 , la constituyen los fluidos de recubrimiento del tracto respiratorio (RTLFs), grupo heterogéneo de sustancias que cubren al epitelio respiratorio desde la mucosa nasal hasta los alvéolos. Los componentes del RTLf son principalmente sustancias antioxidantes como mucina, ácido úrico, ácido ascórbico, vitamina E y tioles (principalmente glutatión reducido) y enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Estos componentes pueden actuar como detoxificantes de los contaminantes ambientales para proteger el epitelio de las vías aéreas, sin embargo, cuando se rebasa el balance normal entre oxidantes y antioxidantes se inicia un estrés oxidativo, es decir, el O_3 reacciona con los lípidos poliinsaturados del RTLf (peroxidación lipídica) produciendo radicales libres como hidroperóxidos, aldehídos y ozónido de Criegge (13). Estas sustancias altamente reactivas son las responsables de iniciar el daño sobre el epitelio de las vías respiratorias y generar la formación y liberación de numerosas citocinas proinflamatorias induciendo inflamación (14). A su vez, este proceso inflamatorio puede servir como una fuente adicional de radicales libres y contribuir a que se perpetúen las alteraciones patofisiológicas (15). Además, se ha postulado que estos radicales libres pueden producir alteración de proteínas tanto estructurales como funcionales, ruptura de la banda de DNA y alteraciones en el metabolismo celular (15). La reacción del O_3 con los ácidos grasos poliinsaturados dentro del pulmón y la producción de radicales libres, puede inducir daño fuera del tracto respiratorio (16), aunque se requieren concentraciones muy altas para que esto suceda.

Adicionalmente, el O_3 produce inactivación de algunas proteínas como la endopeptidasa neutra (NEP), enzima responsable de degradar a la sustancia P, principal neurotransmisor del sistema excitatorio no-adrenérgico no-colinérgico (e-NANC) (17, 18).

El O₃ altera profundamente la fisiología pulmonar provocando cambios en su función (p.ej. disminución del flujo y del volumen espiratorio forzado, disminución significativa en la capacidad vital y reducción de la capacidad inspiratoria máxima, aumento en la frecuencia respiratoria), así como broncospasmo, estimulación de la actividad mucociliar y aumento en la reactividad de las vías aéreas (19, 20 21,22).

La toxicidad del O₃ está determinada por numerosos parámetros, que incluyen especie, edad, sexo, estado nutricional y sistemas celulares de protección (3, 23); además, la severidad del daño producido por este gas depende de la concentración y el tiempo de exposición (24, 25).

Hiperreactividad

La hiperreactividad de las vías aéreas es una de las principales alteraciones respiratorias que puede desencadenar la inhalación de O₃ (26). 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. Diversos estudios han demostrado que en humanos la inhalación aguda de O₃ a concentraciones tan bajas como 0.08-0.12 ppm (27, 28), o desde 0.3-0.8 ppm en cobayos, ratas y perros (17, 26, 29, 30, 31) es capaz de producir hiperreactividad de las vías aéreas.

Uno de los mecanismos más importantes involucrados en la hiperreactividad inducida por O₃, es el daño al epitelio de las vías aéreas con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias y mediadores químicos como interleucina-8 (IL-8), IL-6, factor de estimulación de crecimiento de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), RANTES, molécula de adhesión ICAM-1 y leucotrieno B₄ (LTB₄), las cuales provocan inflamación (11, 14, 32) que a su vez induce el desarrollo de hiperreactividad.

Por otro lado, el epitelio de las vías aéreas produce un factor de relajación, probablemente prostaglandina E₂ (PGE₂). Algunos investigadores han demostrado que el daño funcional del epitelio de las vías aéreas inducido por O₃ provoca que el músculo liso traqueobronquial responda en forma exagerada a diferentes agonistas constrictores (33, 34, 35), y que ésto podría deberse a que disminuye la producción de esta prostaglandina, por lo que las respuestas a los estímulos constrictores son más intensas (36, 37, 38).

Otros mecanismos que pueden intervenir en la hiperreactividad aérea son el agotamiento en las reservas de antioxidantes como vitamina C (39, 40), así como daño epitelial que provoca aumento en la permeabilidad, lo que facilita la penetración de sustancias químicas broncoconstrictoras (41). Se mencionan también otras teorías como la inducción del reflejo vagal, la estimulación del e-NANC, la disminución de la relajación adrenérgica y el aumento en la concentración de Ca²⁺ citosólico (42, 43, 44).

Inflamación

Está bien documentado en diferentes especies el desarrollo de un proceso inflamatorio pulmonar asociado con la exposición a bajas concentraciones de O₃, caracterizado por un aumento en el número de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (45, 46). Se sabe que estas células liberan mediadores químicos como PGD₂, LTs, tromboxano A₂ (TXA₂), factor de agregación plaquetaria (PAF) y citocinas proinflamatorias como, TNF- α , IL-1, así como fibronectina, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y anión superóxido, todos ellos implicados en la patogénesis del daño tisular e hiperreactividad de las vías aéreas y producidos en cantidades elevadas después de la inhalación de O₃ (45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53). El aumento en la acumulación de estos mediadores se ha observado tanto en LBA, como *in situ* en cortes histológicos de pulmón de animales expuestos a O₃ (49). Una vez reclutadas y activadas las células inflamatorias, la liberación de sus mediadores químicos

intensificará la respuesta inflamatoria y la reactividad de las vías aéreas (32, 54).

La actividad quimiotáctica en las vías aéreas, como en otros tejidos, es importante en los procesos inflamatorios. Hay evidencias de que las células del epitelio bronquial también pueden liberar factores quimiotácticos para linfocitos, lo cual sugiere que son capaces de modular la respuesta inmune local (55). Además de las células del epitelio bronquial, existen en el aparato respiratorio numerosas fuentes potenciales de actividad quimiotáctica, tanto el macrófago alveolar, como las células cebadas, y aún los linfocitos mismos, son capaces de liberar factores quimiotácticos (56).

Alteraciones Morfológicas.

Un gran número de reportes en la literatura describen daño tisular a lo largo de las vías aéreas causado por la inhalación de O₃. Estudios histopatológicos sobre los efectos de la exposición a este gas, demuestran que los bronquiolos y los alveólos desarrollan los más importantes daños morfológicos (57). Los efectos iniciales de la exposición aguda a O₃ están bien establecidos e incluyen daño epitelial bronquiolar y alveolar, edema e infiltración inflamatoria (58, 59, 60, 61).

El O₃, aún a concentraciones ambientales (0.1-0.5 ppm), induce cambios morfológicos en el aparato respiratorio. La intensidad de los cambios varía de acuerdo a la concentración, el tiempo de exposición, la especie animal, el nivel del tracto respiratorio y el tipo celular (62). En las vías respiratorias altas, las células ciliadas son las más vulnerables; se ha observado daño en estas células en el tejido nasal de monos expuestos a 0.15 y 0.3 ppm de O₃ durante 6 días, y en la tráquea de ratas expuestas por 7 días a 0.5 ppm (62, 63). Después de exposiciones crónicas se ha encontrado hiperplasia de células caliciformes (64). En las vías aéreas pequeñas, el bronquiolo terminal es particularmente sensible al O₃ (65), el daño a este nivel ocurre desde 2 h de exposición a 0.5 ppm (58). En los estudios de exposiciones prolongadas a O₃, los resultados varían; algunos investigadores

proponen que el epitelio bronquiolar no cambia en ratas expuestas a 0.5 ppm de O₃ durante 6 y 12 meses (66), mientras que en otros estudios se demostró hiperplasia nodular epitelial en los bronquiolos de ratas expuestas a 0.5 ppm durante 180 días (67) y durante 12 meses (68).

En este contexto, se ha demostrado en animales que exposiciones repetidas a diferentes concentraciones de O₃ (1-3 ppm) causan inflamación y fibrosis intersticial (69, 70), hiperplasia y metaplasia de la mucosa nasal (64, 71), metaplasia del epitelio traqueal (72) e hiperplasia de células no ciliadas y de neumocitos tipo II (73), también se ha desarrollado enfisema con períodos prolongados (3 a 5 meses) de exposición a 1 ppm de O₃ (54). Asimismo, bajo ciertas circunstancias, el O₃ puede inducir cambios preneoplásicos en las células epiteliales de la tráquea de rata (74).

Tolerancia.

En el campo de la farmacología y la toxicología, el fenómeno en el cual se atenúa gradualmente el efecto de uno o varios agentes sobre las funciones fisiológicas cuando estos son administrados en forma repetida, se conoce como tolerancia (75). El concepto de tolerancia sobre los efectos del O₃ en la salud, ha sido utilizado para describir el fenómeno en el cual individuos expuestos a O₃, adquieren resistencia al efecto de exposiciones subsecuentes (76).

Exposiciones agudas a concentraciones ambientales de O₃ (0.06-0.25 ppm) causan disminución de la función pulmonar y síntomas como tos, dolor durante la inspiración profunda y respiración más corta. Los cambios en el funcionamiento pulmonar incluyen aumento en la resistencia de las vías aéreas y en la frecuencia respiratoria, así como disminución en el volumen espiratorio y en la capacidad pulmonar total (77). Mientras que la toxicidad con altas concentraciones de O₃ está bien establecida, existen pocos experimentos enfocados a estudiar el daño pulmonar inducido por exposiciones prolongadas con niveles ambientales de O₃. En

estudios con exposiciones repetidas a O₃, tanto en humanos como en animales, se ha encontrado que el decremento inicial en la función pulmonar se atenúa con exposiciones subsecuentes (78).

En 1989, Tepper y col. reportaron daño epitelial e inflamación en la región bronquiolar terminal en pulmones de ratas expuestas a 0.5 ppm de O₃ durante 5 días, que persistió aún cuando las alteraciones funcionales desaparecieron (79), ésto sugiere que a pesar del desarrollo de tolerancia a las pruebas funcionales el daño morfológico persiste. Sin embargo, se ha encontrado que exposiciones más prolongadas generan también una adaptación morfológica. El mecanismo por el cual las células del epitelio del tracto respiratorio desarrollan tolerancia está poco entendido. En estudios enfocados a la región centroacinar pulmonar de la rata, sitio primario de daño e inflamación en exposiciones agudas, se ha encontrado reorganización epitelial, metaplasia y hiperplasia alveolar después de exposiciones crónicas (más de 90 días) (80, 81). En uno de los experimentos más prolongados que se han realizado con exposiciones repetidas a O₃ (20 meses), Plopper y col. (82) concluyeron que el epitelio de las vías aéreas desarrolla resistencia al daño oxidativo de los contaminantes aéreos, a través de la reorganización epitelial en favor de tipos celulares que muestran menor susceptibilidad al daño inducido por O₃, es decir, se reorganiza en favor de una población celular no ciliada. Los cambios varían de acuerdo al sitio y son más pronunciados en aquellas porciones del árbol traqueobronquial que son más afectadas con exposiciones agudas, como el epitelio bronquiolar terminal de la región centroacinar. Dentro de los mecanismos antioxidantes que se activan durante el desarrollo de tolerancia del epitelio al daño oxidativo por contaminantes aéreos, se encuentra el incremento en la actividad de los sistemas enzimáticos involucrados en la protección celular del daño producido por radicales libres, como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (83).

Aunque los cambios en la función respiratoria se atenúan con exposiciones repetidas a O₃, la reactividad e inflamación de las vías aéreas no ha sido estudiada adecuadamente bajo estas condiciones. En este sentido, sólo existe un reporte

previo en humanos donde la exposición crónica a O₃ indujo tolerancia a la reactividad de las vías aéreas (84). En vista de que la exposición a O₃ parece ser un factor que empeora los síntomas de asma en pacientes que viven en ciudades muy contaminadas (85), es importante investigar el desarrollo y los mecanismos involucrados en la tolerancia a la hiperreactividad inducida por O₃.

HIPÓTESIS.

1. La exposición a O₃ produce hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas del cobayo.
2. La exposición a O₃ provoca liberación de factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos en las vías aéreas, como parte del proceso inflamatorio.
3. Exposiciones repetidas a O₃ inducen el desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas.
4. La tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas está asociada a una disminución de la inflamación y de los factores quimiotácticos.

OBJETIVOS.

1. Evaluar la persistencia de hiperreactividad de las vías aéreas *in vivo* a sustancia P, en cobayos expuestos a 0.3 ppm de O₃ durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días.

previo en humanos donde la exposición crónica a O₃ indujo tolerancia a la reactividad de las vías aéreas (84). En vista de que la exposición a O₃ parece ser un factor que empeora los síntomas de asma en pacientes que viven en ciudades muy contaminadas (85), es importante investigar el desarrollo y los mecanismos involucrados en la tolerancia a la hiperreactividad inducida por O₃.

HIPÓTESIS.

1. La exposición a O₃ produce hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas del cobayo.
2. La exposición a O₃ provoca liberación de factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos en las vías aéreas, como parte del proceso inflamatorio.
3. Exposiciones repetidas a O₃ inducen el desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas.
4. La tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas está asociada a una disminución de la inflamación y de los factores quimiotácticos.

OBJETIVOS.

1. Evaluar la persistencia de hiperreactividad de las vías aéreas *in vivo* a sustancia P, en cobayos expuestos a 0.3 ppm de O₃ durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días.

previo en humanos donde la exposición crónica a O₃ indujo tolerancia a la reactividad de las vías aéreas (84). En vista de que la exposición a O₃ parece ser un factor que empeora los síntomas de asma en pacientes que viven en ciudades muy contaminadas (85), es importante investigar el desarrollo y los mecanismos involucrados en la tolerancia a la hiperreactividad inducida por O₃.

HIPÓTESIS.

1. La exposición a O₃ produce hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas del cobayo.
2. La exposición a O₃ provoca liberación de factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos en las vías aéreas, como parte del proceso inflamatorio.
3. Exposiciones repetidas a O₃ inducen el desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas.
4. La tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas está asociada a una disminución de la inflamación y de los factores quimiotácticos.

OBJETIVOS.

1. Evaluar la persistencia de hiperreactividad de las vías aéreas *in vivo* a sustancia P, en cobayos expuestos a 0.3 ppm de O₃ durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días.

2. Evaluar la inflamación de las vías aéreas inducida por O_3 , a través de las células presentes en el lavado broncoalveolar y en el corte de tejido pulmonar.
3. Evaluar la presencia de factores quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos en el lavado broncoalveolar de cobayos expuestos a O_3 .
4. Determinar si la inhalación repetida de O_3 desencadena tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas, y estudiar si este fenómeno se correlaciona con una disminución de la inflamación y el papel que jugarían los factores quimiotácticos en esta respuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon cobayos Hartley machos con un peso aproximado de 500 g, criados en un ambiente con concentraciones mínimas de O_3 (<0.015 ppm), con aire filtrado, en cajas de acrílico y alimentados *ad libitum*. Se formaron dos grupos experimentales:

- a) Cobayos expuestos 4 horas diariamente a 0.3 ppm de O_3 . Divididos en subgrupos según el número de días de exposición: 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días (6 animales por subgrupo).
- b) Cobayos expuestos a aire filtrado sin O_3 durante 4 horas (grupo control, 6 animales).

Exposición a Ozono.

Los cobayos fueron expuestos a una concentración de 0.3 ppm de O_3 , por un período de 4 horas durante 1, 3, 6, 12, 24 ó 48 días seguidos. El gas fue producido mediante un flujo constante de aire a través de un generador de ozono (marca Puraqua V), que se hace pasar directamente a una cámara de acrílico de 70x30x50 cm. La concentración se estabilizó antes de colocar a los animales en la cámara y se mantuvo en los niveles requeridos regulando la tasa de conversión de aire a O_3 , mediante modificaciones del voltaje. La concentración de O_3 se vigiló constantemente con un analizador ultravioleta de O_3 (modelo 1008 AH, Dasibi Environmental Corp.). El estudio de los animales se realizó 16 a 18 h después de la última exposición.

Experimentos *in vivo*.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 35 mg/kg, y mantenidos bajo anestesia administrándoles 9 mg/kg

por vía intravenosa cada hora. Se disecó y canuló la arteria carótida izquierda, a través de la cual se registró la presión arterial con un transductor de presión (marca Beckman 4-327-0129); asimismo se disecó y canuló la vena yugular derecha, por donde se administraron los fármacos. La tráquea se canuló para ventilar mecánicamente a los cobayos con un miniventilador (marca Harvard Apparatus Ltd. 50-1700), a un volumen corriente de 10 ml/kg y una frecuencia respiratoria de 48 respiraciones por minuto. A todos los cobayos se les administró 0.06 mg/kg de bromuro de pancuronio para suprimir los movimientos respiratorios espontáneos. La presión de insuflación pulmonar se midió con un transductor de broncospasmo (Marca Ugo Basile 7020) conectado a una vía colateral de la sonda endotraqueal. Se construyeron curvas dosis-respuesta no acumulativas a sustancia P por vía intravenosa, en dosis crecientes de 0.0056 a 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Fig. 1).

Lavado Broncoalveolar.

A todos los cobayos se les realizó un lavado broncoalveolar (LBA) una vez terminada la curva dosis-respuesta a la sustancia P. A través de la sonda endotraqueal se introdujeron 5 ml de SSF estéril a 37 C y al cabo de un minuto se aspiró suavemente hasta recuperar el mayor volumen posible. Esta maniobra se repitió un vez más. El líquido recuperado se centrifugó inmediatamente durante 10 min, a 450 g, a 4 C. El sobrenadante se conservó a -20 C para las pruebas de actividad quimiotáctica. El botón celular se resuspendió en 1 ml de solución de PBS y se homogeneizó. Para realizar la cuenta total celular, se pusieron en un tubo de ensaye 40 μl de tinción de Kimura y 10 μl de la suspensión celular; en la cámara de Neubauer se contaron los 4 cuadros periféricos. El número resultante se dividió entre cuatro y éste se multiplicó x 50,000 para obtener el número de células por mililitro, con lo que la muestra se pudo ajustar con PBS para tener 1×10^6 células/ml, para realizar la cuenta celular diferencial. Para ésta, se tomaron 50 μl de la suspensión celular, se realizaron frotis con una citocentrífuga (Wescor Cytospin) y se tiñeron con Romanowski. Además, se practicó la tinción supravital con Azul de

Tripano para evaluar el porcentaje de viabilidad de las células recuperadas en el LBA.

Quimiotaxis.

Para evaluar la presencia de actividad quimiotáctica en el líquido del LBA, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Obtención y Purificación de Eosinófilos.

Cobayos Hartley machos con un peso inicial de 200 g, se inyectaron por vía intraperitoneal 2 veces por semana durante 2 semanas, y posteriormente 1 vez por semana durante un mes con 0.5 ml de suero estéril equino. Bajo anestesia por inhalación de éter a los cobayos se les realizó un lavado peritoneal, inyectando 50 ml de solución salina fisiológica (SSF) a través de una cánula No. 16. Tras un breve masaje abdominal se recuperó el líquido peritoneal, el cual se centrifugó a 475 g, por 10 min a 20 C. El sobrenadante se desechó y los eritrocitos del botón celular se lisaron por choque hipotónico. Los leucocitos se resuspendieron en 1 ml de solución balanceada de sales de Hank (HBSS). Se contaron las células en una cámara de Neubauer y se colocaron sobre un gradiente discontinuo de Percoll, que contenía capas de 2 ml de las siguientes densidades: 1.075, 1.085, 1.09 y 1.105 δ . Los gradientes se centrifugaron a 755 g, por 30 min, a 20 C. Los eosinófilos se cosecharon de la interfase 1.085/1.09 y se lavaron 2 veces con HBSS. El número y la pureza de los eosinófilos se evaluaron tiñendo las células con Kimura y contándolos en un hematocitómetro, se ajustó el número de eosinófilos a 1×10^6 células /ml. La viabilidad celular se estimó por exclusión con Azul Tripano.

Obtención y Purificación de Neutrófilos.

Para cosechar estas células, se inyectaron intraperitonealmente 30 ml de glucógeno al 0.1% en SSF a un cobayo de 500 g de peso. Dieciocho horas después, se realizó un lavado peritoneal como se describió anteriormente. También

los neutrófilos se purificaron en gradientes discontinuos de Percoll, se cosecharon de la interfase 1.075/1.085 δ y se les dio el mismo tratamiento que a los eosinófilos.

Migración de Eosinófilos y Neutrófilos.

La actividad quimiotáctica en el líquido del LBA se evaluó según la técnica modificada de la cámara de Boyden (86) usando filtros de nitrocelulosa con poros de 8 μm . En el compartimento inferior de la cámara se colocaron aproximadamente 25 μl de soluciones control (buffer, leucotrieno B4 y factor activador de plaquetas) y de líquido broncoalveolar de todos los grupos experimentales. Después se colocó el filtro prehumedecido y finalmente el compartimento superior de la cámara, donde se colocaron 50 μl de la suspensión celular. La cámara se incubó a 37 C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante 90 min. Los filtros se retiraron, se fijaron en metanol y se tiñeron con tinción de Hema-Gurr. Todas las muestras se probaron por triplicado y sólo se contaron las células que migraron completamente a través del filtro. Se contaron 5 campos en cada filtro con microscopio fotónico a 40 x.

Determinación de Superóxido Dismutasa.

La superóxido dismutasa (SOD) extracelular se midió en el líquido del LBA a través de una prueba de ELISA por el método de biotina-estreptoavidina-peroxidasa, para lo cual se aisló SOD de eritrocitos de cobayo. Los eritrocitos se obtuvieron de cobayos clínicamente sanos, fueron lavados dos veces con PBS (pH 7.2) con inhibidores proteolíticos (inhibidor de la tripsina, aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonil) y timerosal, lisados por choque hipotónico y reconstituidos con PBS. La suspensión se pasó secuencialmente a través de un filtro de vidrio silanizado, un papel Whatman del #1 y una membrana Millipore de 0.22 mm. De la solución resultante, la SOD fue purificada utilizando cromatografía por afinidad con sefarosa 4B activada con bromuro de cianuro, unida a anticuerpos monoclonales humanos para SOD. La enzima purificada se pasó nuevamente a través de una columna de cromatografía por afinidad con sefarosa 4B, unida a la proteína A, para

eliminar una posible contaminación con la fracción Fc unida en forma inespecífica a la SOD.

Las placas de ELISA se activaron con la SOD purificada de cobayo. La muestra del líquido del LBA se mezcló con anticuerpos monoclonales humanos para SOD marcados con biotina. Esta mezcla se agregó a las placas de ELISA y se incubó a temperatura ambiente por 1 h en un agitador automático. Las placas se sometieron a 10 ciclos de lavado con una mezcla de PBS, Tween 20 y Triton X-100. Después de una incubación por 30 min con estreptoavidina-peroxidasa, las placas se lavaron nuevamente 10 veces, y se incubaron en un buffer de citratos con o-fenilendamina y H₂O₂ (pH 4.3). La reacción se detuvo con 5% de ácido sulfúrico (vol/vol), y la muestra se leyó a 492 nm usando un lector de ELISA (Multiskan MS model MCC/340, Labsystems).

Estudio Histopatológico.

Se practicaron estudios de microscopía de luz de cortes de las vías aéreas, tanto centrales como periféricas. Los tejidos se tomaron inmediatamente después de la muerte del animal y fueron fijados en formalina amortiguada al 10%, posteriormente se procesaron por el método de inclusión en parafina para hacer cortes de 4 µm de grosor que se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (H y E) para su estudio.

En el estudio histopatológico se consideraron los siguientes cambios tisulares: inflamación, alteraciones del epitelio, hipertrofia del músculo liso peribronquiolar, intersticial y vascular, ruptura de paredes alveolares y engrosamiento intersticial. Se evaluaron de acuerdo a los siguientes grados: 0=ausente, 1=discreto, 2=moderado y 3=severo.

Análisis Estadístico.

Los resultados de la curva a la sustancia P fueron expresados como $-\log$ de la dosis efectiva 50% ($-\log DE_{50}$), esto es, la dosis del agonista a la cual se obtuvo el 50% de la respuesta. Esta última se calculó mediante análisis de regresión lineal, con los datos previamente transformados a probits. La evaluación estadística fue realizada utilizando análisis de varianza de una vía seguido de comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunnett. Para buscar posibles asociaciones entre dos eventos se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. Para analizar los resultados del estudio histopatológico se utilizó la correlación de Spearman. El nivel de significancia se fijó en valores de $p < 0.05$ a nivel bimarginal.

RESULTADOS

Experimentos *in vivo*.

En los animales expuestos a O₃ durante 1, 3, 6, 12 y 24 días, se observó un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta a la sustancia P (Fig. 2). Al evaluar el -log DE₅₀ de todos estos grupos con respecto al grupo control, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$): 3.6184 ± 0.0482 , 3.6325 ± 0.0554 , 3.9247 ± 0.0547 , 3.6218 ± 0.0371 , 3.7773 ± 0.0687 y 3.2059 ± 0.0535 respectivamente, lo que indica el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas. Sin embargo, a los 48 días de exposición a O₃ no se presentó más esta hiperreactividad, ya que el -log DE₅₀ regresó a los niveles del grupo control (3.3291 ± 0.0464).

Lavados Broncoalveolares.

Todos los grupos experimentales expuestos a O₃ mostraron un aumento significativo ($p < 0.01$) en la cuenta celular total comparados con el grupo control, y casi todos los grupos expuestos presentaron un aumento significativo ($p < 0.05$, 0.01) en el número de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Por el contrario, el número de linfocitos se incrementó solamente en los grupos expuestos durante 24 y 48 días ($p < 0.01$) (Fig. 3). Ya que todos los LBA fueron realizados después de la administración de SP, y con el propósito de descartar la posible participación de esta sustancia en el desarrollo de la inflamación, otro grupo de cobayos ($n=4$) fue expuesto a 0.3 ppm de O₃ por un día y estudiado 18 h después sin la aplicación de SP. Los resultados de estos experimentos demostraron que la sola exposición a O₃ fue suficiente para inducir inflamación de las vías aéreas (Cuadro 1).

Por otro lado, se observó una correlación altamente significativa entre el grado de reactividad aérea y la cuenta celular total ($r = 0.55$, $p < 0.0005$), de macrófagos ($r = 0.54$, $p < 0.0005$), de neutrófilos ($r = 0.47$, $p < 0.005$) y de eosinófilos ($r = 0.53$, $p < 0.0005$) (Fig. 4), pero no así entre la hiperreactividad de las vías aéreas y la cuenta linfocitaria.

Quimiotaxis.

Los neutrófilos mostraron migración hacia el líquido del LBA de los grupos experimentales de 3, 6, 12, 24 y 48 días de exposición a 0.3 ppm de O_3 , con significancia estadística ($p < 0.01$, 0.05) con respecto al control: 116/5 campos, 104/5 campos, 150/5 campos, 238/5 campos, 208/5 campos y 31/5 campos, respectivamente, todos ellos observados con el objetivo 40x (Fig. 5).

Los eosinófilos no presentaron migración estadísticamente significativa hacia el líquido del LBA.

En los controles negativos (solución buffer) no se apreció migración. Los controles positivos para neutrófilos y eosinófilos (leucotrieno B4 y PAF, respectivamente), sí mostraron migración.

Superóxido Dismutasa.

Los niveles de SOD en el líquido del LBA del grupo control (0.29 ± 0.061 mg/ml), se incrementaron por arriba de 30 veces ($p < 0.05$) desde el primer día de exposición a O_3 (8.98 ± 3.19 mg/ml). El aumento más importante fue mayor de 60 veces ($p < 0.01$) y se observó en los grupos de 3, 6 y 12 días de exposición (17.62 ± 3.17 , 15.90 ± 3.81 y 15.40 ± 2.81 mg/ml, respectivamente). A los 24 y 48 días de exposición a O_3 , la SOD regresó a los niveles basales (0.98 ± 0.08 y 0.48 ± 0.08 mg/ml) (Fig.6).

Estudio Histopatológico.

Al analizar la presencia de inflamación en el corte de tejido pulmonar a través de una prueba de correlación de Spearman, se observó una correlación positiva entre el grado de inflamación y los días 0 a 3 de exposición a 0.3 ppm de O₃ ($p < 0.002$), posteriormente se encontró una correlación negativa entre la inflamación y los días 3 a 48 de exposición ($p < 0.009$) (Fig. 7). El infiltrado estaba constituido predominantemente por macrófagos, sin embargo en todos los casos se apreciaron numerosos eosinófilos, neutrófilos y algunos linfocitos.

En cuanto a las alteraciones epiteliales, se encontró hiperplasia discreta del epitelio en 37% de los animales expuestos a O₃, sin embargo este hallazgo no guarda relación con el número de días de exposición, y se apreció también en uno de los animales control. Asimismo, se observó metaplasia epitelial leve, en este caso con una tendencia a desarrollarse principalmente en los animales con períodos de exposición más prolongados (12, 24 y 48 días), al practicarle análisis estadístico, estos grupos se compararon con los de menor tiempo de exposición a O₃ (1, 3, 6 días) a través de una prueba de Fischer, la cual resultó significativa ($p = 0.00115$) (Fig.7).

La hipertrofia del músculo liso se observó sobre todo a nivel vascular, pero en forma inconsistente tanto en sujetos control como problema.

La ruptura de paredes alveolares, en grado discreto o moderado, se presentó en la mayoría de los animales ozonizados: 24 de 35 cobayos expuestos a O₃, es decir, en 69% de los animales problema, sin embargo esta alteración también se observó en 4 de los 6 animales control.

Por último, en muy pocos de los animales expuestos a O₃ se apreció engrosamiento intersticial (17%), y en todos los casos fue a expensas del infiltrado inflamatorio.

CUADROS

Y

FIGURAS

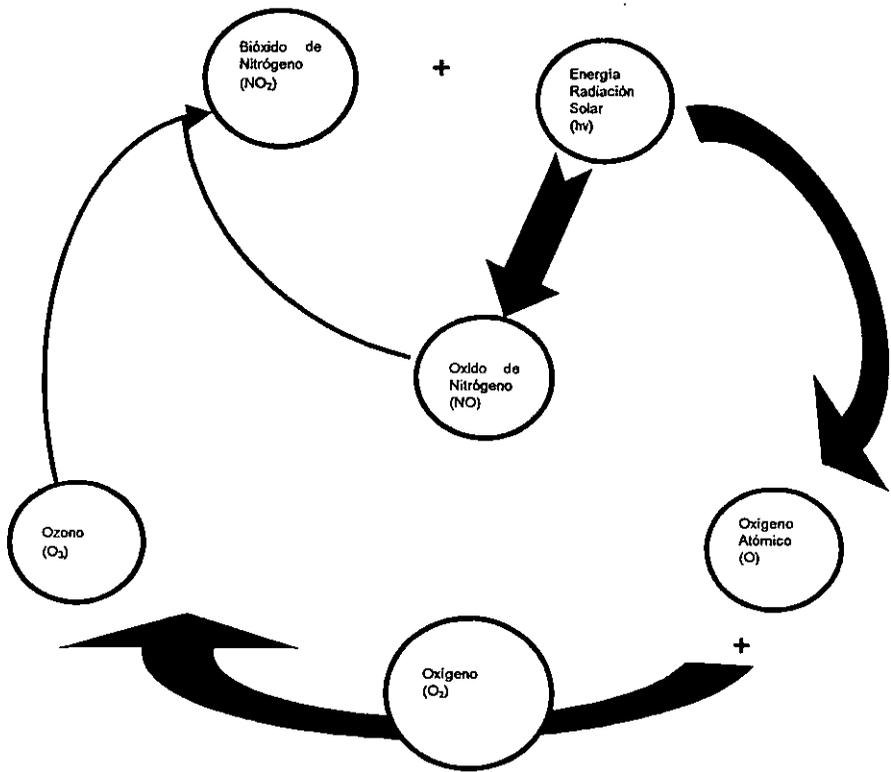


Fig. A. Ciclo Fotolítico del NO_2 .

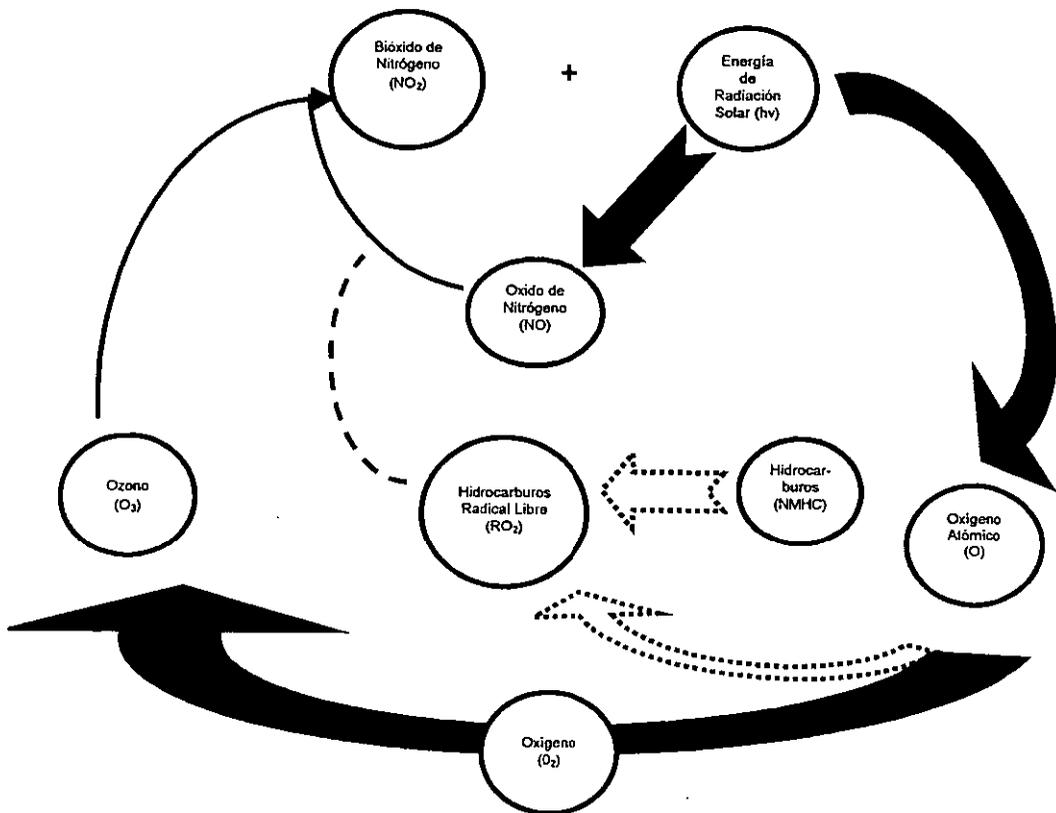


Fig. B. Interacción de los Hidrocarburos con el Ciclo Fotolítico del NO₂.

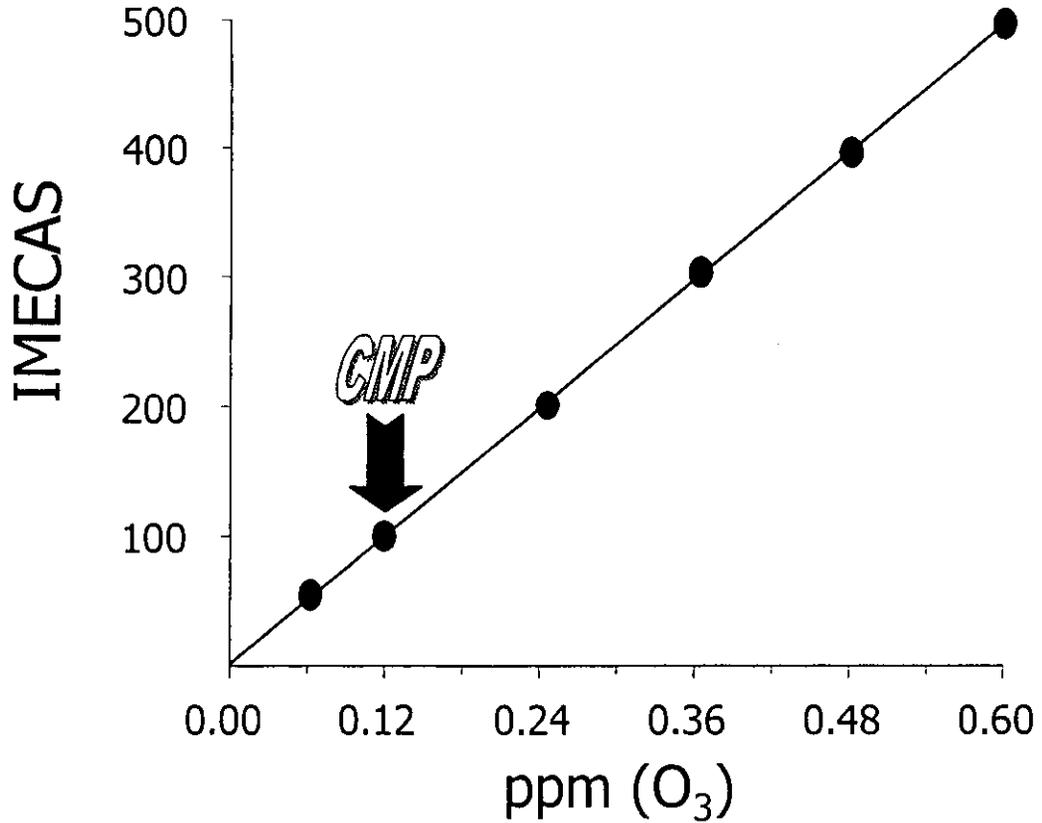


Fig. C. Equivalencia del IMECA con ppm de Ozono.
CMP = Concentración máxima permitida.

	No Expuestos (CONTROL)	Expuestos por 1 Día a 0.3 ppm O ₃	
	Con SP (n=6)	con SP (n=7)	sin SP (n=4)
Cels totales/ml (x10 ⁵)	1.781 ± 0.147	3.125 ± 0.262 **	4.504 ± 0.287 **
Macrófagos (x10 ⁵)	1.277 ± 0.114	1.949 ± 0.129 *	3.279 ± 0.199 **
Neutrófilos (x10 ⁴)	0.186 ± 0.029	0.489 ± 0.075 *	0.510 ± 0.036 *
Eosinófilos (x10 ⁴)	0.280 ± 0.028	0.580 ± 0.067 *	0.610 ± 0.044 *
Linfocitos (x10 ⁴)	0.037 ± 0.016	0.107 ± 0.021 ns	0.106 ± 0.027 ns

SP=Sustancia P. *p<0.05 y **p<0.01. Prueba de Dunnett con todos los grupos de estudio.

Cuadro 1. Efecto de la exposición a O₃ por un día sobre la inflamación de las vías aéreas sin la administración de SP.

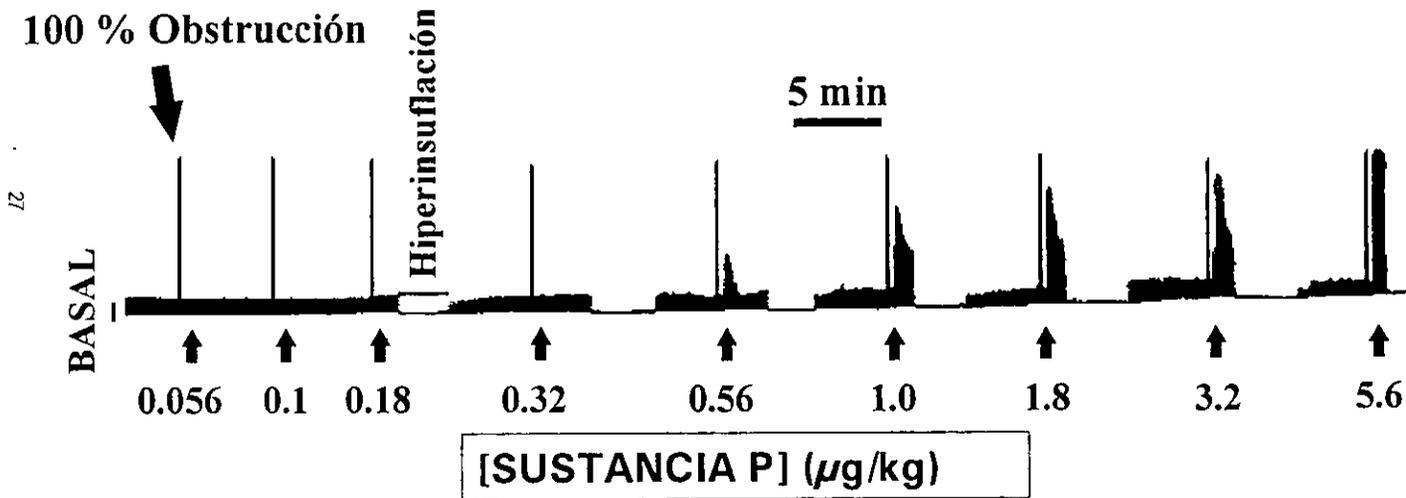


Fig.1 Registro original de los cambios en la presión de insuflación pulmonar durante la administración de diferentes concentraciones de sustancia P. La flecha grande representa el 100% de obstrucción durante la oclusión transitoria de la sonda endotraqueal antes de cada administración del fármaco.

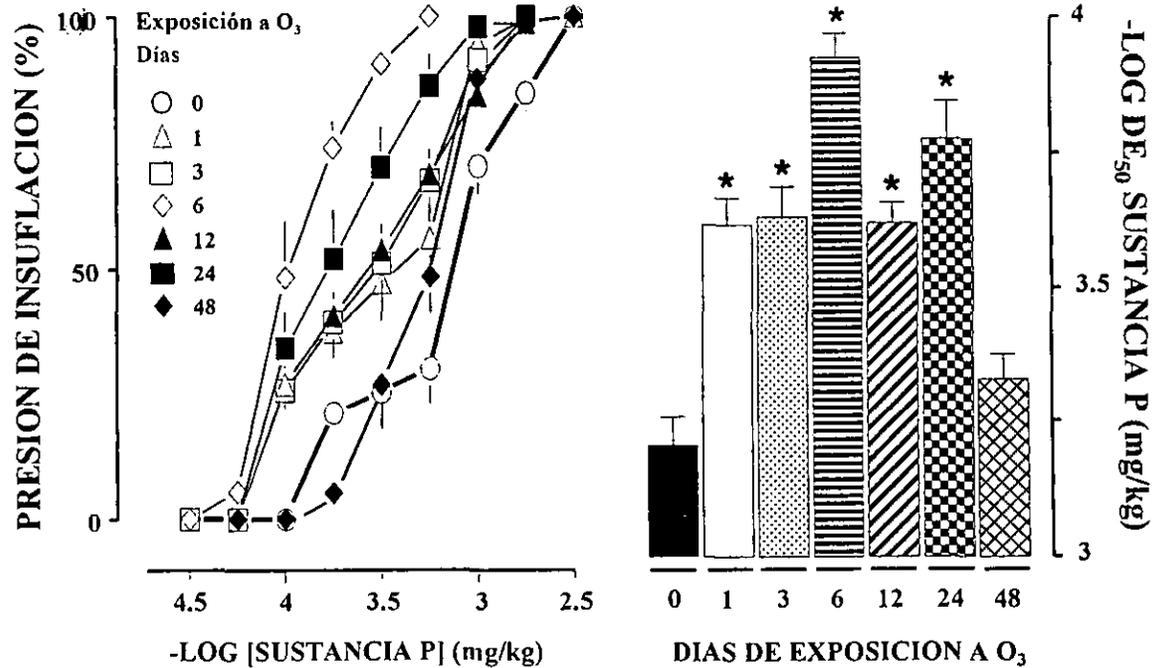


Fig.2 Efecto de la exposición a aire o a 0.3 ppm de O₃ por 4h/día durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días en la reactividad de las vías aéreas a la sustancia P en cobayos. *Izquierda:* curva dosis-respuesta a SP; *derecha:* logaritmo negativo de la DE₅₀. Los símbolos representan el promedio de 6-7 animales. p<0.01.

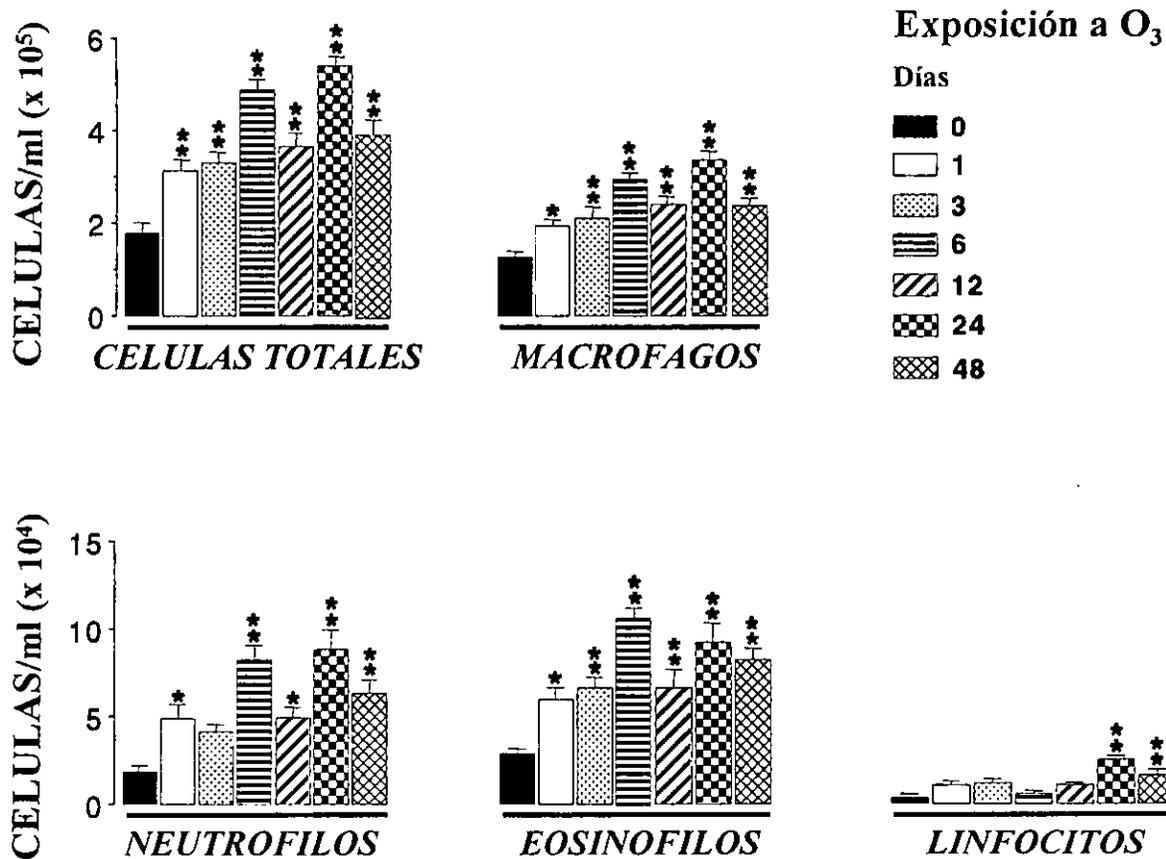


Fig. 3 Cambios en el conteo celular total y diferencial de los lavados broncoalveolares de cobayos expuestos a aire o a 0.3 ppm de O₃ por 4h/día durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 días. Las barras representan el promedio de 6-7 animales. * p<0.05, ** p<0.01.

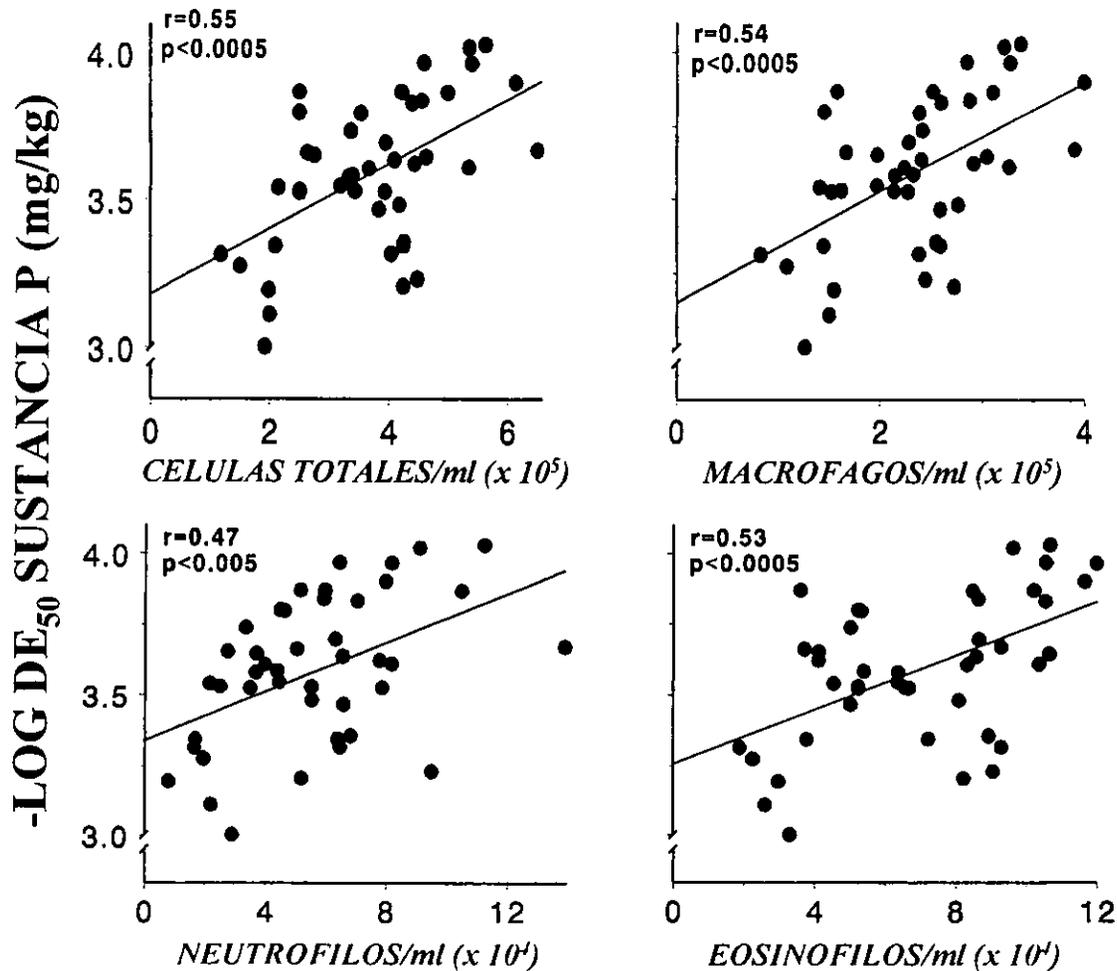


Fig. 4 Correlación entre la reactividad de las vías aéreas a la SP y el conteo celular total y diferencial.

Exposición a O₃

Días 0 1 3 6 12 24 48

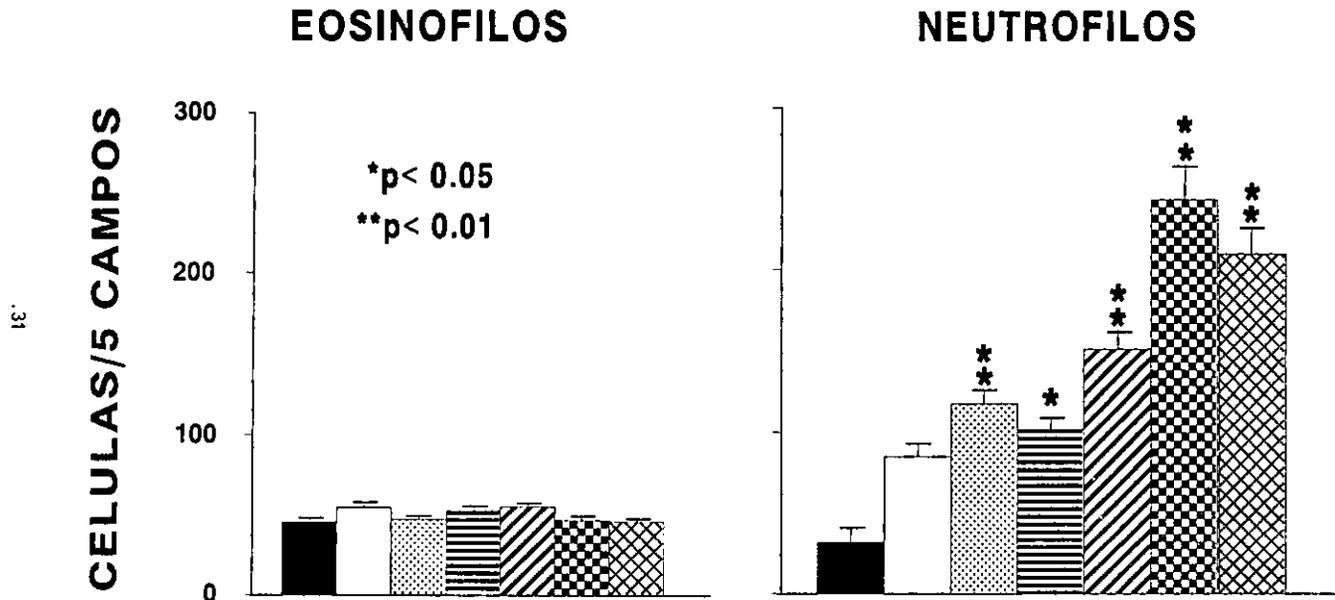


Fig.5 Factores Quimiotáticos.

Migración de Eosinófilos y Neutrófilos. Número de células / 5 campos
40x.

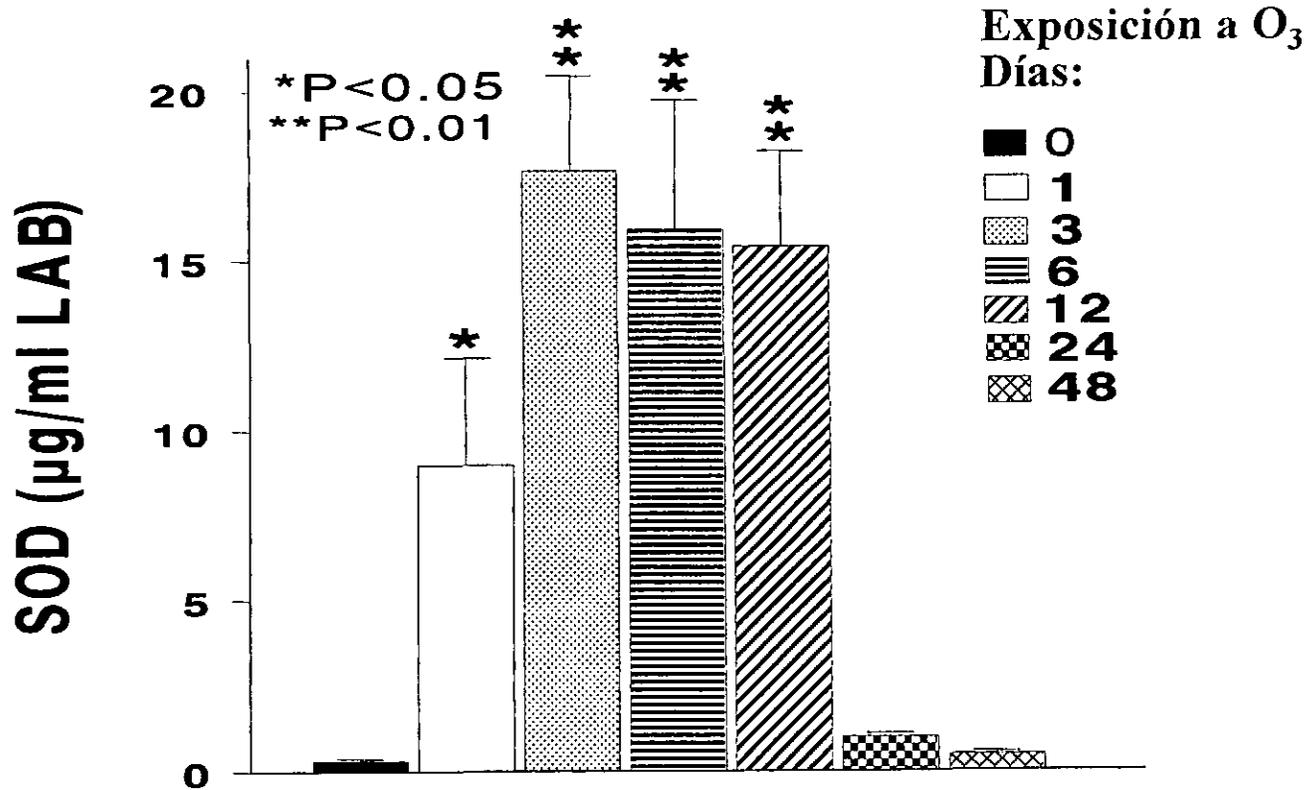


Fig. 6 Efecto de la exposición crónica a 0.3 ppm de O_3 sobre la concentración de superóxido dismutasa (SOD) en el líquido del lavado broncoalveolar (LAB).

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la exposición a 0.3 ppm de O₃ por 4 h diarias durante 1, 3, 6, 12 y 24 días, indujo hiperreactividad de las vías aéreas a la sustancia P, y que este cambio desapareció a los 48 días de exposición, lo cual indica que se desarrolló un fenómeno de tolerancia al O₃.

El análisis de las células recuperadas en el LBA ha sido ampliamente utilizado como un parámetro de la inflamación pulmonar en estudios de daño pulmonar agudo, tanto en animales como en humanos. Es un hecho bien conocido que la exposición a O₃ en concentraciones mayores de 1 ppm, induce un proceso inflamatorio en las vías aéreas (87). En el presente estudio observamos un aumento en el número de células inflamatorias del LBA, tanto eosinófilos, como neutrófilos y macrófagos, durante los 48 días de exposición a 0.3 ppm de O₃, lo cual indica que una baja concentración de O₃ es suficiente para desencadenar la inflamación. Por lo tanto, se debe considerar al cobayo como un modelo adecuado para la investigación de la toxicidad de este gas a concentraciones ambientales.

Para tratar de explicar el papel que juegan las células inflamatorias en el fenómeno de hiperreactividad de las vías aéreas inducida por ozono, se ha demostrado que son una fuente importante de anión superóxido, sustancia que ha sido considerada marcador de activación celular. Las especies reactivas del oxígeno, incluyendo al anión superóxido, han sido implicadas en la hiperreactividad a metacolina, histamina y bradicinina en cobayos, ratas y gatos (88, 89). Es posible especular que la liberación de anión superóxido por las células inflamatorias, puede también estar involucrada en el aumento de la reactividad a la SP. Además, las células inflamatorias son capaces de liberar numerosos mediadores proinflamatorios como tromboxano A₂, leucotrieno C₄ y TNF α los cuales pueden inducir directamente hiperreactividad en el músculo liso traqueobronquial (57, 90). En apoyo al posible

papel de la inflamación en este fenómeno, encontramos una fuerte correlación entre las células totales, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos recuperados en el fluido del lavado broncoalveolar y la hiperreactividad de las vías aéreas, por lo menos durante los primeros 24 días de exposición.

En un estudio previo en cobayos (29) se encontró que la exposición a 0.3 ppm de O₃ provocó una mayor reactividad a la SP, pero no a la histamina o a la acetilcolina. Este trabajo, y el realizado por nosotros, sugieren que el incremento en el anión superóxido y la inflamación, pueden no ser suficientes para inducir hiperreactividad inespecífica de las vías aéreas, y que un factor adicional está actuando para promover hiperreactividad específica a la SP. En este contexto, se ha propuesto que en cobayos la inactivación oxidativa de la endopeptidasa neutra (NEP), principal enzima capaz de inactivar a la SP, puede representar un mecanismo importante en la hiperreactividad de las vías aéreas a este agonista después de la exposición a O₃. Murlas y cols. (91) corroboraron la inactivación de esta enzima a través de una prueba bioquímica realizada 30 minutos después de la exposición a 3 ppm de O₃. Sin embargo, en nuestra investigación no determinamos la inactivación de esta enzima, por lo que no podemos saber si este mecanismo está o no involucrado en el desarrollo de hiperreactividad a la SP, en las condiciones en las que llevamos a cabo nuestro modelo.

Otros mecanismos adicionales podrían estar potencialmente involucrados en la hiperreactividad a SP inducida por O₃ y merecen mayor evaluación. Por ejemplo, el O₃ aumenta la respuesta bronquial no-adrenérgica no-colinérgica (dependiente de la liberación de SP), a la estimulación eléctrica de campo al introducir un componente sensible a la atropina (44). Por lo tanto, ese posible mecanismo específico inducido por O₃ podría ser la habilidad de la SP para inducir la liberación de acetilcolina de los nervios colinérgicos (92). Además, se ha demostrado que la SP actúa sobre algunos lechos vasculares provocando la liberación de NO y prostanoïdes a partir de las células endoteliales (93, 94). De esta manera, un posible efecto del O₃ sobre algún componente vascular sensible a la SP, puede también jugar un papel importante en el

incremento de la respuesta a esta sustancia después de la exposición a O₃.

Uno de los hallazgos más importantes de nuestro estudio fue que a los 48 días de exposición a O₃, la hiperreactividad a la SP desapareció, es decir, ésta sufrió un fenómeno de tolerancia después de la exposición crónica a este gas. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos probablemente involucrados en el desarrollo de la hiperreactividad aguda de las vías aéreas inducida por O₃ es la producción de anión superóxido. Por esta razón, investigamos sobre el posible papel de la SOD, enzima que desempeña un papel importante en el metabolismo de algunos radicales libres, en el desarrollo de la tolerancia al efecto del O₃. Aquí encontramos que la SOD se incrementó 30 veces desde el primer día de exposición a O₃, lo cual pone de manifiesto la posibilidad de que este mecanismo antioxidante, constituya una de las respuestas activadas en forma inmediata para contrarrestar el efecto nocivo de las especies reactivas del oxígeno, liberadas por la inflamación inducida por O₃, como ha sido demostrado para el glutatión en la rata (81). Sin embargo, la SOD no podría ser responsable de la tolerancia al efecto del O₃ a los 48 días de exposición, dado que los niveles de esta enzima regresaron drásticamente a los niveles basales desde los 24 días de exposición, cuando aún estaba presente la hiperreactividad. En este contexto, se ha reportado el incremento de otros compuestos antioxidantes después de la exposición a O₃. Kodavanti y cols. (95) encontraron que el glutatión total y el ácido úrico, dos sustancias antioxidantes importantes, aumentaron en el fluido broncoalveolar y en homogenados pulmonares de cobayos después de una semana de exposición a 0.8 ppm de O₃ durante 23 h al día, mas no así a 0.2 ppm de O₃. Sin embargo, encontraron que el ascorbato sí se incrementaba después de la exposición a 0.2 ppm de O₃. De igual forma, Tepper y cols. (79) observaron un discreto aumento en los niveles de ascorbato en homogenados pulmonares de rata, después de 3 días de exposición a 0.5 ppm de O₃. Por lo tanto, es posible que otros mecanismos antioxidantes diferentes a la SOD, estén involucrados en el desarrollo de tolerancia con exposiciones crónicas a O₃.

Otro hallazgo interesante fue que a los 48 días de exposición a O₃, la estrecha

correlación entre la reactividad aérea y las células inflamatorias en el LBA ya no estuvo presente, ya que la hiperreactividad de las vías aéreas desapareció pero el incremento en el número de células en el lavado broncoalveolar persistió. Como se mencionó, durante los primeros 24 días de exposición a O₃, las células inflamatorias están probablemente involucradas en la inducción de la hiperreactividad a través de la liberación del anión superóxido y otros mediadores. De este modo, a los 48 días de exposición a O₃, la disociación entre la inflamación y la hiperreactividad puede sugerir que en este momento las células inflamatorias se encuentran aún bajo la influencia de factores quimiotácticos, pero que han perdido su estado de activación, con la consecuente disminución en la liberación de sus mediadores. Esta hipótesis está en total acuerdo con la notable disminución en los niveles de SOD, que implica una reducción en la liberación de anión superóxido a partir de estas células.

La cuenta celular en el LBA, por sí sola, no refleja adecuadamente los cambios celulares ocurridos en el parénquima de los pulmones expuestos a O₃ (94). Por esta razón decidimos complementar el trabajo con el estudio histopatológico de los pulmones. En este aspecto, observamos inflamación en todos los cortes de tejido pulmonar de los animales expuestos a O₃, apreciándose una tendencia importante a disminuir en los animales expuestos por períodos más prolongados, lo cual puede correlacionar con el desarrollo de tolerancia a la hiperreactividad y la presencia de células inflamatorias en el LBA. En investigaciones sobre el papel que juegan las células inflamatorias en el daño inducido por O₃, se establece que el acumulo de neutrófilos dentro del tejido, después de la exposición a este contaminante, refleja probablemente un aumento en la migración hacia el espacio intersticial en respuesta a diferentes estímulos quimiotácticos, como citocinas y eicosanoides derivados de células inflamatorias y epiteliales (97). Asimismo, se ha demostrado que el daño inducido por este gas, disminuye cuando la migración neutrofílica es inhibida bajo condiciones de exposición continua (98), lo que sugiere que estas células juegan un papel importante en la amplificación del daño inicial, pero que en exposiciones crónicas disminuye su participación. Por otro lado, algunos autores asocian el daño y la proliferación epitelial a la liberación de proteasas y mediadores inflamatorios por los

macrófagos alveolares durante la fase de exposición aguda a O_3 (77). Otro de los hallazgos histopatológicos importantes, fue el desarrollo de metaplasia epitelial, principalmente en los animales con los períodos más largos de exposición a O_3 . Esto concuerda con lo reportado por Plopper y cols. (82), en donde concluyen que el epitelio de las vías respiratorias desarrolla una respuesta adaptativa al daño producido por este contaminante, a través de una reorganización epitelial en favor de tipos celulares más resistentes, particularmente de una población celular no-ciliada. Se reportan también cambios en la población celular del epitelio de las vías aéreas hacia una hiperplasia de células mucosas (62), alteración que nosotros no encontramos en nuestro estudio, y se propone que existe algún mecanismo por el cual las proteasas que derivan de neutrófilos y macrófagos inducen esta hiperplasia, con lo que el moco producido por estas células protege al epitelio del daño oxidativo bajo condiciones de exposición prolongada. Otra de las alteraciones morfológicas que se asocian a la exposición crónica a O_3 , es el engrosamiento intersticial por elevación en la síntesis de colágena y aumento en los elementos del tejido conectivo (69). En nuestro trabajo no encontramos fibrosis intersticial, consideramos que probablemente se requieren períodos de exposición más prolongados para que se desarrolle esta alteración. Sin embargo, sí observamos engrosamiento intersticial pero a expensas del infiltrado inflamatorio, y solamente en el 17% de los sujetos problema. Por último, se reporta también el desarrollo de enfisema pulmonar en ratas con períodos prolongados de exposición a 1 ppm de O_3 (73). En nuestro caso observamos solamente ruptura de paredes alveolares, sin embargo este cambio se presentó tanto en pulmones control como expuestos, por lo que es una alteración que no podríamos asociar con la exposición a O_3 .

Finalmente, el estudio de las enfermedades respiratorias, consecuencia de la contaminación atmosférica, es fundamental para implementar programas de salud pública y de protección ambiental. La prevalencia de enfermedades respiratorias obstructivas crónicas y cáncer pulmonar en países con altos niveles de contaminación (99), sugiere que la exposición prolongada a estos contaminantes puede contribuir significativamente al desarrollo de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

La exposición a 0.3 ppm de O₃ (250 IMECAs), concentración que con frecuencia se alcanza en la Ciudad de México, produce hiperreactividad de las vías aéreas a la SP en cobayos.

El infiltrado inflamatorio juega un papel importante en el desarrollo de esta hiperreactividad.

A los 48 días de exposición a esta concentración de O₃, se produce un fenómeno de tolerancia a la hiperreactividad de las vías aéreas a la SP.

La superóxido dismutasa no participa en el desarrollo del fenómeno de adaptación al O₃.

El cambio en la composición de la población epitelial a favor de tipos celulares más resistentes, como el desarrollo de metaplasia epitelial, sugiere una respuesta adaptativa.

LITERATURA CITADA

1. U. S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. Research Triangle Park, N.C. Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office. (1993).
2. Jones, R.R.: Ozone depletion and its effects on human populations. British J. Dermatology, 123 (suppl.41): 2-6 (1992).
3. Mehlman, M.A. and Borek, C.: Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. Environ. Res., 41: 36-53 (1987).
4. U. S. Environmental Protection Agency, Review of the National Ambient Air quality standards for ozone: assessment of scientific and technical information. OAQPS staff paper. Research Triangle Park, N.C. Office of Air Quality Planning and Standards; EPA report no. EPA-450/2-92/001. Available from NTIS, Springfield, VA; PB92-190446 (1989).
5. Bravo, H., Perrin, F., Sosa, R. Y Torres, R.: Incremento de la contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la Ciudad de México. Ingeniería Ambiental, 1 (40): 8-14 (1988).
6. U. S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. Research Triangle Park, N.C. Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office. (1978).
7. SEDUE. Informe sobre el estado del medio ambiente en México, 1985.
8. Reportes de la Calidad del Aire en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México; SEDESOL 1993 Y 1994.
9. Hakerman, J.R., Plopper, C.G., Hyde, D.M., St. George, J.A., Wilson, D.W. and Dungworth, D.L.: Response of macaque bronchiolar epithelium to ambient concentrations of ozone. Am. J. Pathology, 143 (3): 857-866 (1993).
10. Kreit, J.W., Gross, K.B., Moore, T.B., Lorenzen, T.J., D'Arcy, J., and Eschenbacher, W.L.: Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. J. Appl. Physiol., 66 (1): 217-222 (1989).

11. Pryor, W.A.: Ozone in all its reactive splendor. J. Lab. Clin. Med., 122: 483-486 (1994).
12. Takahashi, Y., Aida, S., Suzuki, E., Ito, Y., Miura, T. and Kimura, Y.: Cytochrome P450 2B1 Immunoreactivity in bronchiolar and alveolar epithelial cells after exposure of rats to ozone. Toxicol. and Appl. Pharmacol., 128: 207-215 (1994).
13. Cross, C.E., van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Louie, S. and Halliwell, B.: Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. Environ. Health Perspect., 102 (Suppl 10): 185-191 (1994).
14. Rochelle, L.G., Fischer, B.M., Krunkosky, T.M., Wright, D.T. and Adler, K.B.: Environmental toxins induce intracellular responses of airway epithelium through reactive species of oxygen and nitrogen. Chest, 109(3): 35S-39S (1996).
15. Wright, D.T., Cohn, L.A., Hongfei Li, Fischer, B., Cheng Ming Li and Adler, K.B.: Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. Environ. Health Perspect., 102 (Suppl 10): 85-90 (1994).
16. Pryor, W.A.: How far does ozone penetrate into the pulmonary air tissue boundary before it reacts? Free Radical Biol. And Med., 12: 83-88 (1992).
17. Murlas, C.G. and Roum, 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).
18. Shore, S.A., Stimler-Gerard, N.P., Coats, S.R., and Drazen, J.M.: Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. Am. Rev. Respir. Dis., 137: 331-336 (1988).
19. Foster, W., Costa, D.L. and Langenback, E.G.: Ozone exposure alters tracheobronchial mucociliary function in humans. J. Appl. Physiol., 63: 996-1002 (1987).
20. Hazucha, M.J., Bates, D.V. and Bromberg, P.A.: Mechanisms of action of ozone on the human lung. J. Appl. Physiol., 67: 1535-1541 (1989).
21. Folinsbee, L.J., McDonnell, W.F. and Horstman, D.H.: Pulmonary function and symptom responses after 6.6 hour exposure to 0.12 ppm ozone with moderate exercise. J. Air Pollut. Control Assoc., 38: 28-35 (1988).
22. Sommer, B., Montaña, L.M., Chávez, J., Gustin, P. and Vargas, M.H.: Guinea pig lung resistance shows circadian rhythmicity not influenced by ozone. Respiration Physiology, 113: 223-229 (1998).

23. Gunnison, A.F., Finkelstein, I., Weideman, P.A., Wei-Yi Su, Sobo, M. and Schlesinger, R.B.: Age-dependent effect of ozone on pulmonary eicosanoid metabolism in rabbits and rats. Fundam. Appl. Toxicol., 15: 779-790 (1990).
24. Hazucha, M.J.: Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. J. Appl. Physiol., 62: 1671-1680 (1987).
25. Menzel, D.B.: Toxicity of ozone, oxygen and radiation. Ann. Rev. Pharmacol., 10: 379-394 (1970).
26. Campos, M.G., Segura, P., Vargas, M.H., Vanda, B., Ponce-Monter, H., Selman, M. and Montaña, L.M.: O₃-induced hiperresponsiveness to noncholinergic system and other stimuli. J. Appl. Physiol., 73: 354-361 (1992).
27. Golden, J.A., Nadel, J.A. and Boushey, H.A.: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. Am. Rev. Resp. Dis., 118: 287-294 (1978).
28. McDonnell, W.F., Horstman, D.H., Abdul-Salaam, S., Ragio, 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. Indus. Health, 3: 507-517 (1987).
29. Segura, P., Montaña, L.M., Bazán-Perkins, B., Gustin, P. and Vargas, M.H.: Ozone at high-pollution urban levels causes airway hyperresponsiveness to substance P but not to other agonists. Environ. Toxicol. and Pharmacol., 3: 91-95 (1997).
30. 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: 1174-1179 (1987).
31. 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. Resp. Dis., 141: A252 (1990).
32. Holtzman, M.J., Fabbri, L.M., O'Byrne, P.M., Gold, B., Aizawa, H., Walters, E., Alpert, S. and Nadel, J.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. Am. Rev. Respir. Dis., 127: 686-690 (1983).
33. Barnes, P.J., Cuss, F.M. and Palmer, J.B.: The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. Br. J. Pharmacol., 86: 685-691 (1985).

34. Hay, D.W.P., Farmer, S.G., Reaburn, D., Muccitelli, R.M., Wilson, K.A. and Fedan, J.S.: Differential effects of epithelium removal on the responsiveness of guinea pig tracheal smooth muscle to bronchoconstrictors. Br. J. Pharmacol., 92: 381-388 (1987).
35. Montañó, L.M., Selman, M., Ponce-Monter, H. and Vargas, M.H.: Role of airway epithelium on the reactivity of smooth muscle from guinea pigs sensitized to ovalbumin by inhalatory method. Res. Exp. Med., 188: 167-173 (1988).
36. Braunstein, G., Lavat, C., Brunelleschi, S., Benveniste, J., Marsac, J. and Brink, C.: Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea pig isolated trachea are modulate by epithelial prostaglandin E₂ production. Br. J. Pharmacol., 95: 300-308 (1988).
37. Brunelleschi, S., Haye-Legrand, I., Lavat, C., Norel, X., Benveniste, J. and Brink, C.: Platelet-activating-factor-acether-induced relaxation of guinea pig airway muscle: role of prostaglandin E₂ and the epithelium. J. Pharmacol. Exp. Ther., 243: 356-363 (1987).
38. Alpert, S.E., Walenga, R.W., Jaspers, I., Qingshan Qu and Lung Chi Chen: Ozone inactivates cyclooxygenase in human tracheal epithelial cells without altering PGHS-2 or protein. Am. J. Physiol., 272 (16): L879-L887 (1997).
39. Davis, W.B. and Pacht, E.R.: Extracellular antioxidant defenses. In: The Lung: Scientific Foundations. New York: Raven Press, 1991; 1821-1826.
40. Bucca, C., Rolla, G. and Farina J.C.: Effect of vitamin C on transient increase of bronchial responsiveness in conditions affecting the airways. Ann. N.Y. Acad. Sci., 669: 175-187 (1992).
41. Bhalla, D.K., Daniels, D.S. and Luu, N.T.: Attenuation of ozone-induced airway permeability in rat by pretreatment with cyclophosphamide, FPL 55712, and indomethacin. Am. J. Cell Biol., 7: 73.80 (1992).
42. Lundberg, J.M., Martling, C.R. and Saria, A.: Substance P and capsaicin induce contraction of human bronchi. Acta Physiol. Scand., 119: 49-53 (1983).
43. 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 Ca²⁺. J. Appl. Physiol., 75(3): 1315-1322 (1993).
44. Sommer, B., Vargas, M.H., Segura, P., Bazán-Perkins, B., Carbajal, V., Chávez, J., Gustin, P. and Montañó, L.M.: Effect of different ozone concentrations on the

- neurogenic contraction and relaxation of guinea pig airways. Fundam. Clin. Pharmacol., 11: 501-511 (1997).
45. Driscoll, K.E., Vollmuth, T.A. and Schlesinger, R.B.: Acute and subchronic O₃ inhalation in the rabbit: response of alveolar macrophages. J.Toxicol. Environ. Health, 21: 27-43 (1987).
46. Driscoll, K.E. and Schlesinger, R.B.: Alveolar macrophage-stimulated neutrophil and monocyte migration: effects of *in vitro* O₃ exposure. Toxicol. Appl. Pharmacol., 93: 312-318 (1988).
47. Pendino, K.J., Laskin, J.D., Shuler, R.L., Punjabi, C.J. and Laskin, D.L.: Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase. J. Immunol., 151: 7196-7205 (1993).
48. Driscoll, K.E. and Maurer, J.K.: Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity. Toxicol. Pathol., 19: 398-405 (1991).
49. Pendino, K.J., Shuler, R.L., Laskin J.D. and Laskin, D.L.: Enhanced production of interleukin-1, tumor necrosis factor- α and fibronectin by rat lung phagocytes following inhalation of a pulmonary irritant. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 11: 279-286 (1994).
50. Devlin, R.B., McDonnell, W.F., Mann, R., Becker, S., House, D.E., Schreinemachers, D. and Koren, H.S.: Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 4: 72-81 (1991).
51. Sies, H. and de Groot, H.: Role of reactive oxygen species in cell toxicity. Toxicol. Lett., 64/65: 547-551 (1992).
52. Yeadon, M., Wilkinson, D., Darley-Usmar, V., O'Leary, V.J. and Payne A.N.: Mechanisms contributing to ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs. Pulm. Pharmacol., 5: 39-50 (1992).
53. Sayers, T.J., Wiltout, T.A., Bull, C.A., Denn, A.C., Pilaro, A.M. and Lokesh, B.: Effects of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. J. Immunol., 141: 1670-1671 (1988).
54. Warren, J.S., Kundel, S.L., Cunninghamham, T.W., Johnson, K.L. and Ward, P.A.: Macrophage-derived cytokines amplify immune-complex triggered O₂-responses

- by rat alveolar macrophages. Am. J. Pathol., 130: 489-494 (1988).
55. Robbins, R.A., Shoji, S., Linder, J., Gossman, G.L., Allington, L.A., Klassen, L.W. and Rennard, S.I.: Bronchial epithelial cells release chemotactic activity for lymphocytes. Am. J. Physiol., 257: L109-L115 (1989).
56. Plopper, C.G., Dungworth, D.L. and Tyler, W.S.: Pulmonary lesions in rats exposed to ozone: a correlated light and electron microscopy study. Am. J. Pathol., 71: 375-394 (1973).
57. Arsalane, K., Gosset, P., Vanhee, D., Voisin, C., Hamid, Q., Tonnel, A. And Wallaert, B.: Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages *in vitro*. Am. J. Respir. Cel Mol. Biol., 13: 60-68 (1995).
58. Stephens, R.J., Sloan, M.F., and Evans, M.J.: Early response of lung to low levels of ozone. Am. J. Pathol., 74: 31-58 (1973).
59. Pino, M.V., Levin, J.R., Stovall, M.Y. and Hyde, D.M.: Pulmonary inflammation and epithelial injury in response to acute ozone exposure in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 112: 64-72 (1982).
60. Koren, H.S., Devlin, R.B., Graham, D.E., Mann, R., McGee, M.P., Horstam, D.H., Kozumbo, W.J., Becker, S., House, D.E., McDonnell, W.F. and Bromberg, P.A.: Ozone induced inflammation in the lower airways of humans subjects. Am. Rev. Respir. Dis., 139: 407-415 (1989).
61. Kerhl, H.R., Vincent, L.M. and Kowalsky, R.J.: Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. Am. Rev. Respir. Dis., 132: 1005-1009 (1985).
62. Takaaki Ito, Yoshiaki Ikemi, Kaoru Ohmori, Hitoshi Kitamura and Masayoshi Kanisawa: Airway epithelial cell changes in rats exposed to 0.25 ppm ozone for 20 months. Exp. Toxic Pathol., 46: 1-6 (1994).
63. Harkema, J.R., Plopper, C.G. and Hyde, D.M.: Effects of an ambient level of ozone on primate nasal epithelial mucosubstances. Quantitative histochemistry. Am. J. Pathol., 127: 90-96 (1987).
64. 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).
65. Barry, B.E., Mercer, R.R. and Miller, F.J.: Effects of inhalation of 0.25 ppm ozone on the terminal bronchioles of juvenil and adult rats. Exp. Lung Res., 14: 225-

- 245 (1988).
66. Gross, K.B. and White H.J.: Functional and pathological consequences of a 52-week exposure to 0.5 ppm ozone followed by a clean air recovery period. Lung, 165: 283-295 (1987).
67. Moore, P.F. and Schwartz L.W.: Morphological effects of prolonged exposure to ozone and sulfuric acid aerosol on the rat lung. Exp. Mol. Pathol., 35: 108-123 (1981).
68. Hiroshima, K., Kohono, T. and Ohwada, H.: Morphological study of the effects of ozone on rat lung. II. Long term exposure. Exp. Mol. Pathol., 50: 270-280 (1989).
69. Freeman, G., Juhas, L.T., Furiosi, N.J., Mussenden, R., Stephens, R.J. and Evans, M.J.: Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (Nitrogen dioxide and ozone). Arch. Environ. Health, 29: 203-210 (1974).
70. Hiroshima, K., Kohono, T., Owada, H. and Hayashi, Y.: A morphological study of the effects of ozone on rat lung. Exp. Mol. Pathol., 47: 327-333 (1987).
71. 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: 143-149 (1990).
72. Penha, P.D. and Werthamer, S.: Pulmonary lesions induced by long-term exposure to ozone. II. Ultrastructure observations of proliferative and regressive lesions. Arch. Environ. Health, 29: 282-288 (1974).
73. Stephens, R.J., Sloan, M.F. and Groth, D.G.: Effects of long-term, low level exposure of NO₂ or O₃ on rat lungs. Environ. Health Perspect, 16: 178-185 (1976).
74. Thomassen, D.G., Harkema, J.R., Stephens, N.D. and Griffith, W.C.: Preneoplastic transformation of rat tracheal epithelial cells by ozone. Toxicol. Appl. Pharmacol., 109: 137-148 (1991).
75. Goodman, L.S. and Gillman, A. The pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. International Edition: McGraw-Hill, 1996.
76. Evans, M.J., Dekker, N.P., Cabral-Anderson, L.J. and Shami, S.: Morphological basis of tolerance to ozone. Exp. Mol. Pathol., 24: 366-376 (1985).
77. Chang, L.-Y., Huang, Y., Stockstill, B.L., Graham, J.A., Grose, E.C., Menache, M.G., Miller, F.J., Costa, D.L. and Crapo, J.D.: Epithelial injury and interstitial

- fibrosis in the proximal alveolar regions of rats chronically exposed to a simulated pattern of urban ambient ozone. Toxicol. Appl. Pharmacol., 115: 241-252 (1992).
78. Horvath, S.M., Gliner, J.A. and Folinsbee, L.J.: Adaptation to ozone: Duration of effect. Am. Rev. Respir. Dis., 123: 496-499 (1981).
79. Tepper, J.S., Costa, D.L., Lehmann, J.R., Weber, M.F. and Hatch, G.E.: Unattenuated structural and biochemical alterations in the rat during functional adaptation to ozone. Am. Rev. Respir. Dis., 140: 493-501 (1989).
80. Barr, B.C., Hyde D.M., Plopper, C.G. and Dungworth, D.L.: Distal airway remodeling in rats chronically exposed to ozone. Am. Rev. Respir. Dis., 137: 924-938 (1988).
81. Barr, B.C., Hyde, D.M., Plopper, C.G. and Dungworth, d.L.: A comparison of terminal airway remodeling in chronic daily versus episodic ozone exposure. Toxicol. Appl. Pharmacol., 106: 384-407 (1990).
82. Plopper, C.G., Fung-Ping Chu, Haselton, C.J., Peake, J., Wu, J. and Pinkerton, K.E.: Dose- dependent tolerance to ozone. I. Tracheobronchial epithelial reorganization in rats after 20 months' exposure. Am. J. Pathol., 144: 404-420 (1994).
83. Plopper, C.G., Duan, X., Buckpitt, A.R. and Pinkerton, K.E.: Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. Toxicol. Appl. Pharmacol., 127: 124-131 (1994).
84. Dimeo, M.J., Glenn, M.G., Holtzman, M.J., Sheller, J.R., Nadel, J.A. and Boushey, H.A.: Threshold concentrations of ozone causing an increase in bronchial reactivity in humans and adaptation with repeated exposures. Am. Rev. Respir. Dis., 124: 245-248 (1981).
85. Romieu, I., Meneses, F., Sienna-Monge, J.L., Huerta, J., Ruiz-Velasco, S., White, M.C., Etzel, R.A. and Hernández M.: Effects of urban air pollutants on emergency visits for childhood asthma in Mexico City. Am. J. Epidemiol., 141: 546-553 (1995).
86. Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med., 115: 453-466 (1962).
87. Aris, R.M., Christian, D., Hearne, P.Q., Kerr, K, Finkbeiner, W.E. and Balmes. J.R.: Ozone-induced airway inflammation in humans subjects as determined by

- airway lavage and biopsy. Am. Rev. Respir. Dis., 148: 1363-1372 (1993).
88. Kudo, M., Nishikawa, M., Ikeda, H. and Okubo, T.: Involvement of superoxide anions in ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. Environ. Toxicol. Pharmacol., 2: 25-30 (1996).
89. Takahashi, T., Miura, M., Katsumata, U., Ichinose, M., Kimura, K., Inoue, H., Takishima, T. and Shirato, K.: Involvement of superoxide in ozone-induced hyperresponsiveness in anesthetized cats. Am. Rev. Respir. Dis., 148: 103-106 (1993).
90. Barnes, P.J., Chung, K.F. and Page, C.P.: Inflammatory mediators and asthma. Pharmacol. Rev., 40: 49-83 (1988).
91. Murlas, C.G., Lang, Z., Williams, G.J. and Chodimella, V.: Aerosolized neutral endopeptidase reverses ozone-induced airway hyperreactivity to substance P. J. Appl. Physiol., 72: 1133-1141 (1992).
92. Hey, J.A., Danko, G., delPrado, M. and Chapman R.W.: Augmentation of neurally evoked cholinergic bronchoconstrictor responses by prejunctional NK2 receptors in the guinea pig. J. Auton. Pharmacol., 16: 41-48 (1996).
93. Bodelsson, G. and Stjernquist, M.: Endothelium-dependent relaxation to substance P in human umbilical artery is mediated via prostanoid synthesis. Hum. Reprod., 9: 733-737 (1994).
94. Bull, H.A., Hothersall, J., Chowdhury, N., Cohen, J. and Dowd, P.M.: Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. J. Invest. Dermatol., 106: 655-660 (1996).
95. Kodavanti, U.P., Hatch, G. E., Starcher, B., Giri, S.N., Winsett, D. and Costa, D.L.: Ozone-induced pulmonary functional, pathological and biochemical changes in normal and vitamin C-deficient guinea pigs. Fundam. Appl. Toxicol., 24: 154-164 (1995).
96. Schultheis, A.H. and Bassett, J.P.: Guinea pig lung inflammatory cell changes following acute ozone exposure. Lung, 172: 169-181 (1994).
97. Hogg, J.C.: Neutrophil kinetics and lung injury. Physiol. Rev., 67: 1249-1295 (1987).
98. Basset, J.P., Bowen-Kelly, E., Brewster, E.L., Elbon, C.L., Reichenbaugh, S.S., Bunton, T. and Kerr, J.S.: A reversible model of acute lung injury based on ozone exposure. Lung, 166: 355-369 (1988).

99. Gong, H.: Health effects of air pollution. A review of clinical studies. Clin. Chest Med., 13: 201-214 (1992).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**