



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN EL
EPITELIO NASAL DE RATAS MACHO
OCASIONADAS POR EXPOSICION
AGUDA A OZONO (O₃)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

VERONICA VELASCO CABELLO



DIRECTOR DE TESIS:

M EN C TERESA I FORQUIL VAN DER GOES

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
274074
2000
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Alteraciones morfológicas en el epitelio nasal de ratas macho ocasionadas por exposición aguda a ozono (O₃)".

realizado por Verónica Velasco Cabello

Con número de cuenta 8826917-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis	M. en C. Teresa Imelda Fortoul van der Goes	<i>T. Imelda Fortoul</i>
Propietario		
Propietario	Dr. Emilio Rojas del Castillo	<i>Emilio Rojas</i>
Propietario	Biól. Ivonne Grisell Sánchez Cervantes	<i>Ivonne Grisell</i>
Suplente	M. en C. Patricia Rivas Manzano	<i>Patricia Rivas</i>
Suplente	Dra. Maricela Villagran Santa Cruz	<i>Maricela Villagran</i>

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz.

**Alteraciones Morfológicas
en el Epitelio Nasal de Ratas
Macho Ocasionadas por
Exposición Aguda a Ozono
(O₃)**

Agradecimientos

A MIS PADRES

Gracias a ellos que me dieron la oportunidad de vivir y me guiaron a ún camino en el cual juntos caminamos y llegamos a una meta a la cual no hubiera llegado sin su cariño, apoyo, ejemplo y dedicación.

A MIS HERMANOS VICENTE, MARIBEL Y MARIO

Les doy gracias ya que ellos me motivaron para seguir adelante y terminar con el camino que me había trazado.

A FEDERICO

Por que con su dedicación y ejemplo fue para mi un motivo para seguir adelante y llegar a terminar esta carrera que con su apoyo moral y académico pude alcanzar.

A TERE

Ya que confió en mi incondicionalmente y gracias a ella pude poner en práctica mis conocimientos y lo más importante es que de ella aún sigo aprendiendo nuevas cosas tanto morales como académicas.

A IVONNE, IRMA y PATY

Gracias por que desde que nos conocimos siempre me apoyaron y enseñaron lo importante que es esta carrera.

A LAURA

Ya que con su colaboración y consejo pude concluir este proyecto.

A VERÓNICA

Por que con su ayuda técnica termine este trabajo y así concluir mis estudios de licenciatura.

A PACO

Ya que el me brindo todo su apoyo técnico para la elaboración de las fotografías que son el entendimiento general del presente trabajo.

A MIS COMPAÑEROS

Por que juntos nos marcamos una meta y nos apoyamos mutuamente, y aun que ya no estemos juntos en un lugar, aun nos seguimos apoyando.

Indice

1. INTRODUCCION	
1.1 Concepto de contaminación atmosférica	2
1.2 Fuentes de emisión	2
1.3 Precursores de la formación del ozono	4
1.4 Ozono	4
1.5 Ciclo del ozono	5
1.6 Contaminación del aire en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México	7
1.7 Sistema respiratorio humano	8
1.8 Anatomía y Fisiología de la nariz	8
1.9 Moco: Protección del epitelio nasal	11
1.9.1 Mucosustancias	11
1.9.2 Glicoproteínas	11
1.9.3 Hipersecreción	12
1.10 Anatomía de la cavidad nasal de la rata	13
1.11 Tipos de respuesta celular al medio	19
1.12 Inflamación	20
1.13 Inflamación de vías aéreas	20
1.13.1 Inflamación aguda	21
1.13.2 Inflamación subaguda	22
1.13.3 Inflamación crónica	23
1.14 Efectos a la salud por ozono	24
1.15 Efectos del ozono en modelos experimentales	25
1.16 Interacción celular con el ozono	26
2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO	27
3. HIPOTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
5. OBJETIVO PARTICULAR	28
6. MATERIAL Y METODO	29
6.1 Animales e inhalación	29
6.2 Técnica de sacrificio	30
6.3 Disección	30
6.4 Procesamiento para microscopía de luz	31
6.5 Análisis de muestras	31
7. RESULTADOS	32
8. DISCUSION	44
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFIA	47

RESUMEN

El ozono (O_3) es un contaminante fotoquímico que se ha reportado en altas concentraciones en la atmósfera de varias ciudades en el mundo, como en el caso de la Cd. de México. Esta concentración elevada, ocasiona alteraciones en la salud de la población, especialmente en el sistema respiratorio. La vía de entrada de este gas es la nariz sitio en el que deben encontrarse alteraciones por la exposición al O_3 ; así se planteo la hipótesis de que si el epitelio nasal es el primer sitio de contacto con el ozono entonces será factible apreciar que en el epitelio que cubre esta cavidad cuando hay contacto con este gas.

Para poder comprobar esta hipótesis, se formaron tres grupos de ratas Wistar macho de 200 g. El grupo I integrado por animales que sirvieron como control y que solo se sometieron a la inhalación de aire filtrado carente de O_3 . El grupo II se expuso a una concentración promedio de 1.25 ppm de O_3 , y sacrificadas dos horas despues de la inhalación. El grupo III inhaló en condiciones similares al grupo II, pero fue sacrificado a los 15 días subsecuentes a la inhalación única de O_3 . La cavidad nasal fué fijada *in situ*, disecada y descalcificada. La zona se dividió en bloques transversales que se procesaron por la histológica habitual y tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E), Azul alcian (AA) y Acido peryodico-reactivo schiff (PAS) y se encontro al epitelio respiratorio del grupo I sin alteraciones, con algunas glándulas. En el grupo II predominaron las alteraciones inflamatorias (dilatación vascular, presencia de neutrófilos); las células ciliadas perdieron sus cilios y se apreciaron zonas con hiperplasia mucoide. En el grupo III los cambios, aunque persistieron, fueron en menor cuantía. En relación con los cambios en las características bioquímicas del moco, se apreció una disminución en el número de glándulas AA+, que comparados con los controles en las que se apreció más PAS+, de esto se concluye, que al haber menos glándulas AA+ hay menos mucinas ácidas que son las que protegen al epitelio cuando interactuan con un oxidante como el ozono, suponiendo así que estas reaccionan como un intento de neutralizar los efectos del contaminante. Así tambien el aumento en la permeabilidad del epitelio (inflamación) es una consecuencia de la irritación ocasionada por el O_3 , como mencionan algunos otros autores. (Harkema y cols (a), 1997). La pérdida de los cilios, aunado al cambio en el moco constituyen factores físicos que alteran los mecanismos de defensa del sistema respiratorio en el sitio, cuya función es filtrar, humectar y atemperar el aire que llegará a las vías respiratorias bajas, y que al no llegar en las mejores condiciones dará como resultado alteraciones funcionales en esta zona del sistema.

1. INTRODUCCION

1.1 Concepto de Contaminación Atmosférica

La contaminación atmosférica se entiende que dentro del aire que forma la atmosfera, hay diversos compuestos químicos que, si bien han existido como componentes del mismo, sus concentraciones se han incrementado notablemente (IMRNR, 1986).

En cuanto a la situación actual, uno de los temas de conversacion más comunes en estos días, al hablar de deterioro ecológico, es la contaminación atmosférica; en todos los periodicos leemos diariamente notas sobre este problema de gran importancia para todos. Los principales contaminantes de la atmósfera son: partículas en suspensión, bióxido de azufre, monóxido de carbono, hidrocarburos y óxidos de nitrógeno así como el ozono, este último es un contaminante que no se emite en los escapes ó chimeneas sino que se forma en la atmósfera a partir de reacciones muy complejas activadas por la luz solar, en las que participan los óxidos de nitrógeno e hidrocarburos (Lacy, 1993).

1.2 Fuentes de Emision

La Ciudad reúne la mayor cantidad de fuentes naturales y artificiales de contaminación: Las cuales son areas erosionadas, basura y defecación a cielo abierto, filtraciones al subsuelo de aguas no tratadas, fábricas, fundidoras, baños públicos, automóviles y aviones por mencionar solo algunas (Legorreta J. 1991).

Dentro del tema de la contaminación ambiental se hace la distinción entre fuentes naturales y antropogénicas, incluyendo en las primeras a los que son originados por procesos naturales y las antropogénicas son aquellas que son formadas por el hombre. (Legorreta J. 1991).

a) Fuentes naturales.- Algunas fuentes son: erupciones volcánicas, incendios forestales, erosión de suelos, polen, bacterias, partículas orgánicas en descomposición, etc. (Godish,1991).

b) Fuentes fijas.- Estas son de gran importancia ya que se ubican en áreas ó zonas industriales donde las emisiones se suman dando a veces un aumento de contaminantes cuando hay un gran número de industrias. Los contaminantes de estas fuentes se clasifican en tres categorías: emisiones (gases), efluentes (líquidos) y sólidos (basura y residuos) dando lugar a problemas en el aire, provocando la formación de *smog*¹ en el agua interfiriendo con la vida acuática y otras alteraciones, y en los suelos la producción de basura y acumulación de agroquímicos. Entre las principales fuentes están las fábricas, plantas procesadoras de cemento, fábricas de fertilizante, fundidoras, baños públicos, incineradores industriales, refinerías, termoelectricas nucleares, etc.(Godish,1991; Gutierrez y cols. 1997).

c) Fuentes móviles.- Estas fuentes son principalmente vehículos automotores, así como aviones, locomotoras, barcos, motocicletas etc. Así el 81 % en masa de contaminantes emitidos es aportado por las fuentes móviles. (IMRNR , 1986).

Los contaminantes emitidos de estas fuentes son muy importantes por si solos y también son importantes ya que muchos de estos son precursores de la formación del ozono. (IMRNR , 1986).

¹ Se llama así al aire combinado con otras moléculas tales como: Monóxido de carbono (CO), Dióxido de azufre (SO₂), Dióxido de nitrógeno (NO₂), Hidrocarburos no metano (HC), material particulado suspendido (MPS) y Ozono (O₃) (IMRNR, 1986).

1.3 Precursores de la formación del ozono

La contaminación atmosférica fotoquímica conocida comúnmente como *smog*, es una mezcla de varios compuestos químicos: óxidos de nitrógeno (NO_x), hidrocarburos reactivos (NMHC) y ozono (O_3), principalmente. El ozono es un contaminante secundario formado en la atmósfera a través de una compleja serie de reacciones químicas de los contaminantes primarios, conocidos como precursores. De estos últimos, los más importantes son los NO_x y los NMHC, las fuentes de emisión de contaminantes antropogénicos son, en primer lugar, los automóviles (NO_x , NMHC), industria ligera y pesada (NO_x , NMHC) y expendios de gasolina (NMHC). La situación geográfica contribuye a agravar el problema dado que la formación del ozono depende grandemente de la radiación solar, cuando más cerca se está del ecuador mayor es el potencial energético que se recibe (Bravo y cols. 1988).

1.4 El Ozono

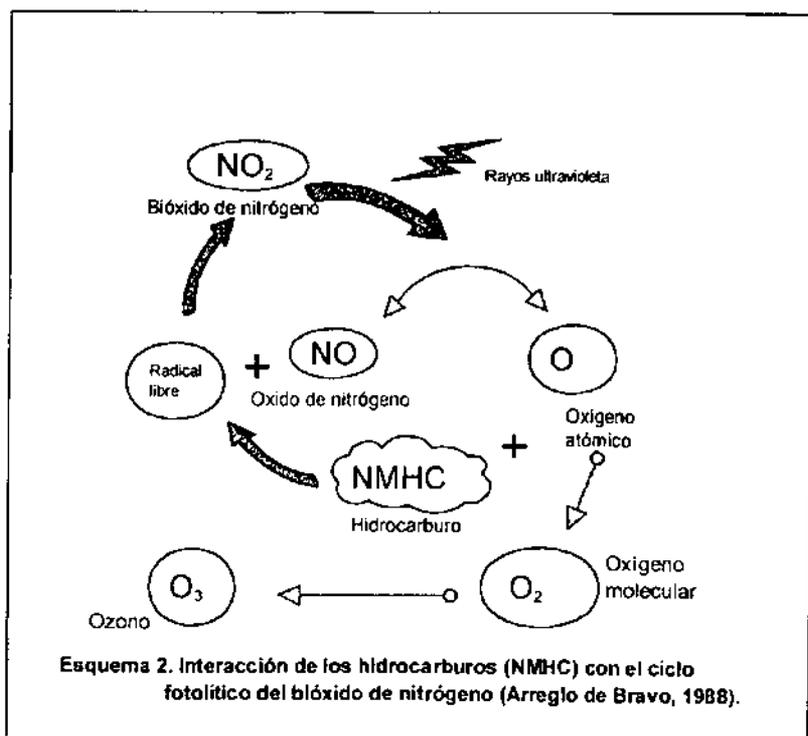
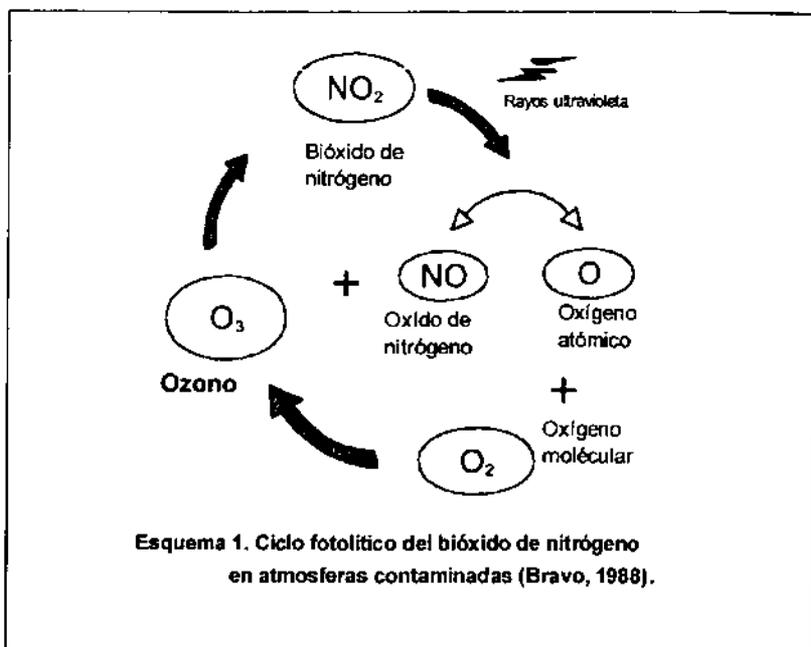
El ozono (O_3) es una forma del elemento oxígeno (O) que tiene tres átomos en cada molécula en vez de dos, como ocurre en las moléculas normales de oxígeno. El ozono puede ser estratosférico y troposférico

Se le llama ozono estratosférico ya que se forma en la estratosfera por la acción de la radiación solar sobre las moléculas de oxígeno mediante un proceso llamado fotólisis, que destruye las moléculas de O_2 para proveer el oxígeno atómico que, a su vez, se combina con el oxígeno molecular para producir el ozono, este mismo es destruido continuamente por procesos naturales en los que están presentes: oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y cloro ó bromo; estas sustancias están presentes desde antes de que el hombre comenzara a contaminar. Ahora bien los seres

Por otro lado el ozono troposférico se forma también de manera natural, pero como resultado de los procesos de combustión, las concentraciones locales de ozono en latitudes medias del hemisferio norte, se han duplicado en los últimos 100 años. El aumento del ozono a sido superior al 1 % anual desde fines del siglo XIX; este aumento de ozono no puede compensar la disminución ocurrida en la estratósfera (OMM, 1995).

1.5 Ciclo del Ozono

Uno de los precursores del ozono, el dióxido de nitrógeno (NO_2) se rompe en dos óxido de nitrógeno (NO) y oxígeno atómico (O), con lo cual se inicia el mecanismo de formación del ozono este es un absorbedor muy eficiente de la energía ultravioleta solar que llega a la superficie de la tierra. Esta interacción genera lo que se conoce como reacción fotolítica (Esquema 1: Ciclo fotolítico del bióxido de nitrógeno.) El ciclo comienza cuando la molécula NO_2 se rompe en dos NO y O este O se une al oxígeno molecular (O_2) formando el O_3 (ozono), pero como esto debe estar en equilibrio el ciclo se cierra cuando el NO y el O_3 se unen para formar nuevamente el NO_2 liberando una molécula de O_2 . El ciclo descrito explica la formación de ozono en atmósferas contaminadas, de acuerdo al ciclo fotolítico el O_2 y el NO deberian destruirse en las mismas cantidades y seguir con el ciclo normal, pero no sucede así en atmosferas altamente contaminadas, ya que van aumentando las concentraciones de ozono (Esquema 2: Interacción de los hidrocarburos con el ciclo fotolítico del Bióxido de Nitrógeno) por la intervención de los hidrocarburos, es decir la oxidación de la molécula de O es muchas veces más rápida que las de O_3 , así los hidrocarburos (NMHC) se combinan más fácil y más rápido con las moléculas de O (oxígeno atómico) que con el O_2 . Por otro lado de la reacción de O y NMHC se forman radicales libres que oxidan al NO pasandolo a NO_2 , reiniciando con ello el ciclo sin consumir O_3 , explicando así el por qué los altos niveles de este en ambientes urbanos. La concentración oscila de acuerdo con la intensidad de la radiación solar, por esa razón las concentraciones pico se dan a medio día (Bravo y cols. 1988).



1.6 Contaminación del Aire en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

La Ciudad de México conurbada en extensión con algunos municipios del Estado de México constituye la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) que se encuentra rodeada por montañas lo que aumenta el potencial de una severa acumulación de contaminantes atmosféricos. Su situación geográfica y las emisiones de contaminantes atmosféricos, lo convierten en un gran contenedor natural, en el que ocurren complejas reacciones fotoquímicas que dan lugar a compuestos oxidantes como el ozono, así como la formación de ácido sulfúrico y ácido nítrico que constituyen el fenómeno de lluvia ácida (Bravo y cols.1991). Los efectos de la contaminación del aire se complican por la altitud de la Ciudad ya que debido a ello, la población requiere respirar un mayor volumen de aire que el que se respiraría al nivel del mar. El aire de la Ciudad de México se está deteriorando como resultado del desarrollo industrial, las prácticas en el uso del suelo y por el aumento poblacional así como también de los vehículos automotores (IMRNR,1986).

Los contaminantes como el ozono han multiplicado los padecimientos respiratorios que se presentan con un índice mayor de peligrosidad. (Llera, 1984).

1.7 Sistema Respiratorio Humano

La función principal del sistema respiratorio consiste en permitir que la sangre se oxigene y pierda el anhídrido carbónico que contiene, además interviene en la percepción de los olores (Stevens y Lowe, 1995). Las vías aéreas están formadas por una porción conductora y una porción respiratoria.

La porción conductora del sistema respiratorio se compone de las vías aéreas que conducen el aire oxigenado hasta los sitios de intercambio gaseoso dentro del pulmón, donde ocurre el intercambio gaseoso. Estas vías incluyen las que se localizan por fuera y dentro de los pulmones. Las vías conductoras comprenden: cavidad nasal, faringe, laringe, traquea y los dos bronquios principales. Dentro de los pulmones se encuentran los bronquios internos que se ramifican extensamente y dan origen a los bronquiolos de distribución. Estos representan la porción terminal de las vías aéreas de conducción.

La porción respiratoria es la parte de la vía aérea en la cual se lleva a cabo el intercambio gaseoso que incluye a: bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos (Ross y cols., 1997).

1.8 Anatomía y fisiología de la nariz

La nariz tiene una porción externa y una porción interna que se encuentra dentro del cráneo. La porción externa está formada por dos estructuras una cartilaginosa y otra ósea de soporte cubierta por piel y revestida por una membrana mucosa. El puente de la nariz está formado por los huesos nasales que lo mantienen en una posición fija. Como éste tiene una estructura de cartílago, el resto de la nariz externa es ligeramente flexible. Sobre la superficie de la nariz externa se encuentran dos aperturas que se llaman narinas externas (fosas nasales) (Tortora y Anagnostakos, 1993).

La cavidad nasal se extiende de las narinas externas a las conchas, se relaciona hacia arriba con el seno frontal, el seno esfenoidal y la fosa craneal media, hacia abajo esta separada de la cavidad bucal por el maxilar superior; hacia atrás, la cavidad nasal se comunica con la nasofaringe que se puede considerar como la porción posterior de la cavidad (Gardner y cols. 1986). La parte interna de la nariz externa y la nariz interna esta formada por una cavidad nasal que se divide en un lado derecho y en un lado izquierdo por una porción vertical que se llama tabique nasal. La porción anterior de la cavidad nasal que se encuentra en la parte interna de las narinas se llama vestibulo (Tortora y Anagnostakos, 1993).(Figura 1)

Las estructuras internas de la nariz se especializan en tres funciones: calentar, humedecer y filtrar el aire que entra al sistema respiratorio; recibir los estímulos olfativos y proporcionar canales de resonancia para el lenguaje. Cuando el aire entra por las narinas pasa primero a través del vestibulo. El vestibulo está revestido por piel que contiene pelos gruesos que filtran grandes partículas de polvo. El aire pasa hacia la cavidad nasal superior, medio e inferior. Los cornetes que casi alcanzan al tabique nasal, subdividen cada lado de la cavidad nasal en una serie de vias de paso en forma de canal que se conocen como meatos superior, medio e inferior. Una membrana mucosa recubre la cavidad y los cornetes. Los receptores olfativos se encuentran en la membrana que reviste la superficie que se encuentran por arriba del cornete nasal superior y que se llama región olfativa; por abajo de esta región, la membrana contiene capilares y células columnares ciliadas pseudoestratificadas. Los capilares calientan el aire conforme este circula alrededor de los cornetes y meatos. El moco que se secreta en las células de este epitelio, humedece el aire y atrapa partículas de contaminantes. Las secreciones que provienen de los conductos lagrimales y quizá las secreciones de los senos paranasales, también ayudan a humedecer el aire. Los cilios mueven la mezcla de moco y polvo a través de la faringe para que se pueda eliminar del cuerpo (Tortora y Anagnostakos, 1993).

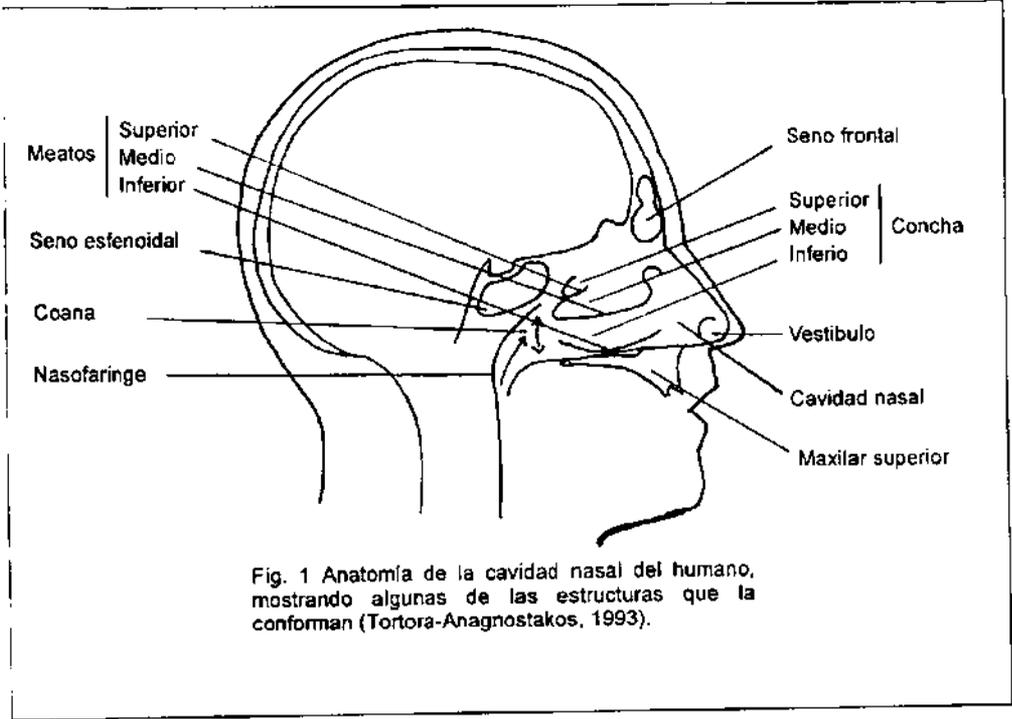


Fig. 1 Anatomía de la cavidad nasal del humano, mostrando algunas de las estructuras que la conforman (Tortora-Anagnostakos, 1993).

1.9 El moco protección del epitelio nasal

1.9.1 Mucosustancias

La composición de moco esta dado por glucoconjugados , sustancias complejas que muestran una extensa heterogeneidad molecular. El moco juega un papel muy importante tanto en las propiedades funcionales de las vías aereas, incluyendo la formación de gel, limpieza de partículas depositadas a lo largo del epitelio y protección de células que se encuentran bajo el epitelio (Boat y cols.1994).

1.9.2 Glucoproteinas

Las glucoproteínas son las mayores constituyentes de la capa mucosa que se encuentra en las vías aereas altas y bajas de mamíferos (Pon D. y cols. 1994); este moco es una mezcla compleja de productos de varias fuentes tales como líquido alveolar, productos de secreción de varias células que se encuentran a lo largo de las vías aereas, glándulas submucosas entre otros (Boat y cols.1994).

Las células secretoras de las glándulas submucosas de las vías aereas consisten en dos tipos de células secretoras: mucosas y serosas. Las células mucosas elaboran una secreción viscosa que contiene glucoproteinas mucosas (mucina) casi exclusivamente, mientras que las células serosas secretan un liquido acuoso que carecen de mucina pero contienen otros glucoconjugados y proteínas (Basbaum , 1994).

La presencia de glucoproteinas neutras y ácidas ha sido demostrado histoquímicamente (principalmente en las células mucosas). Las glicoproteinas ácidas consisten de mucinas sialicas y sulfatadas (Basbaum y cols., 1994).

1.9.3 Hipersecreción

Algunas enfermedades como bronquitis crónica, asma o fibrosis quística tienen una sintoma muy evidente que es la tos y la hipersecreción pero estos síntomas también se presentan en personas fumadoras así como también se ha observado que muchas personas presentan hipersecreción en días de alta contaminación ambiental (Valverde y cols. 1997).

Por otro lado la hipersecreción del mucus glucoprotéico dentro de espacio aéreo luminal por efecto del ozono puede resultar una obstrucción del pasaje bronquiolar provocando una colonización de miles de bacterias. La presencia del moco en exeso puede desarrollar insuficiencia respiratoria y puede contribuir a la morbilidad y mortalidad asociada con algunas enfermedades como las enfermedades respiratorias (Pon y cols. 1994).

Al ser inhalados gases irritantes como dióxido de sulfuro, óxido nítrico o amonio estos pueden disoverse en el fluido luminal producido por células en copa (mucoproductoras) de las vías aéreas, cambiando el pH del fluido a ácido o alcalino (Chul, 1994).

1.10 Anatomía de la Cavidad Nasal de la Rata

El pasaje nasal de la rata consiste en dos grandes compartimentos separados por un septo con tres turbinas (conchas) bien desarrolladas, que se proyectan dentro del lumen las cuales son: nasoturbina, maxiloturbina y etmoturbina. Una ventana septal provee una conexión directa entre el pasaje nasal derecho y el pasaje nasal izquierdo, así como a una vía aérea dentro del ducto nasofaríngeo. La ventana septal es un punto donde convergen el aire y la corriente del mucus. Hay cuatro rutas principales para el flujo del aire que son los meatos dorsal, medio, ventral y lateral (Figura 2).

La simetría bilateral de los ductos nasopalatinos a través de los canales incisivos del paladar duro conectan la cavidad nasal y bucal. Estos ductos son de 0.5 mm de diámetro en un adulto de rata F344, y puede ser una vía de paso para secreciones ó aire. Estos ductos tienen una forma de válvula como ala que impide el paso del material de la cavidad oral al interior de la cavidad nasal (Boorman y cols. 1990).

Marcas específicas en el paladar son importantes para obtener las secciones necesarias para una investigación; según el Programa Nacional de Toxicología La histología del pasaje nasal normal varía extensamente con el plano de la sección I, II y III (figura 3) (Boorman y cols. 1990).

En una sección óptima la mucosa en el nivel I consiste principalmente de epitelio escamoso estratificado queratinizado y epitelio respiratorio (columnar pseudoestratificado), y si el corte se hace un poco más atrás se observa en el meatus dorsal, el epitelio olfatorio (columnar pseudoestratificado); en el nivel II los tres tipos de epitelio están presentes. La región olfatoria esta representada en una sección más posterior, el nivel III en el cual la turbina etmoide es prominente (Figura 4). El lado izquierdo y derecho del pasaje nasal están separados por un septo nasal delicado en la región anterior. En el nivel III ambos lados comunican ventralmente por la ventana

septal. El área superficial total de el pasaje nasal de una rata de 16 semanas es de 1340 mm², cerca de la mitad del area superficial es cubierta por epitelio olfatorio y la otra mitad por epitelio respiratorio y transicional, y de estos un 4% por epitelio escamoso. El órgano olfatorio de Maseña ocupa casi el 2 % del area superficial. El vestibulo nasal es ligeramente cubierto por epitelio escamoso estratificado queratinizado y no hay pelos nasales. El epitelio escamoso cubre el vestibulo nasal extendiéndose a lo largo del piso del meatus ventral al ducto nasopalatino que se une con el epitelio escamoso de la mucosa oral. El epitelio respiratorio se extiende desde el margen del epitelio escamoso del vestibulo a la nasofaringe via ducto nasofaringeal (Boorman y cols. 1990).

El epitelio respiratorio está compuesto por seis tipos celulares morfológicamente distintos: Células columnares ciliadas y no ciliadas, células en forma de copa, células en cepillo, células cuboidales y células basales además restos en la lámina basal de fibras de colágena y reticulares (Figura 5). El epitelio respiratorio que cubre al septum nasal es ciliado y contiene numerosas células en copa, en contraste con el epitelio que cubre el meatus lateral y puntas de las turbinas siendo las células no ciliadas o poco ciliadas con una alfombra de cortas microvellosidades. Las células que cubren el meatus lateral son el llamado epitelio de transición que es donde cambia de un tipo de epitelio a otro (Boorman y cols. 1990).

La lámina propia en la región respiratoria es altamente vascularizada, con poco tejido conectivo elástico y muchas glándulas serosas y mucosas. Las glándulas en la mitad anterior del septum nasal son glándulas tubuloalveolares que consisten de numerosos acinos y largos ductos, los cuales se vacian dentro del vestibulo. La lámina propia de las turbinas así como las paredes laterales también tienen glándulas acinares y tubulares, y sus ductos se abren directamente dentro del seno maxilar ó lumen nasal (Boorman y cols. 1990).

Los vasos de gran calibre son plexos venosos en la lámina propia que dilata la región respiratoria y altera el aire que atraviesa el pasaje nasal. Estas largas células se encuentran en la pared lateral entre la nasoturbinas y la maxiloturbinas (Boorman y cols. 1990).

El epitelio olfatorio se compone de tres tipos celulares sensoriales, basales y sustentaculares (Figura 6) que cubren el tercio superior del septum nasal, gran parte del meatus dorsal incluyendo los accesorios de la nasoturbina, porciones de la pared nasal lateral posterior y turbina etmoides. El órgano de Masera es una pieza aislada de epitelio olfatorio que esta rodeado por epitelio respiratorio en la base del septum nasal cercano a la entrada del ducto faringeo y muy difícil de localizar. (Boorman y cols. 1990).

La lámina propia de la región olfatoria contiene prominentes manojos nerviosos, vasos sanguíneos y glándulas de Bowman. Las glándulas son de tipo tubular simple compuesto de pequeños acinos compactos entremezclados entre los manojos nerviosos. Los ductos de las glándulas de Bowman atraviesan la lámina basal a intervalos regulares que se extienden a través del epitelio olfatorio y se abren en la superficie luminal de la mucosa olfatoria. Estas glándulas pueden contener productos serosos o mucosos.

El tejido linfoide no es común en el pasaje nasal excepto por la asociación de tejido nasal (NALT) con tejido linfoide, el cual es característico por la presencia de uno ó más folículos linfoides difusos (Boorman y cols.1990).

El moco converge en el meato nasofaríngeo y pasa hacia la faringe donde es deglutido con los materiales atrapados. Además el moco previene transudación excesiva de fluido de tejidos dentro del lumen y también previene el pasaje osmótico del agua condensada en la superficie durante la espiración. Así también, la superficie húmeda facilita el sentido del olfato ya que en este medio se disuelven las moléculas olfatorias (Boorman y cols. 1990).

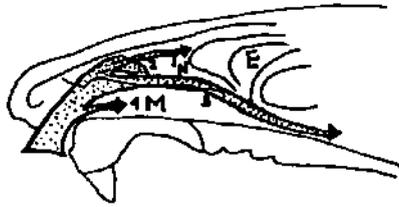


Fig.2 Muestra las cuatro rutas principales del flujo de aire durante la inspiración en la rata. E= turbina etmoide, N= nasoturbinas, M= maxiloturbinas. (Boorman y cols. 1990).

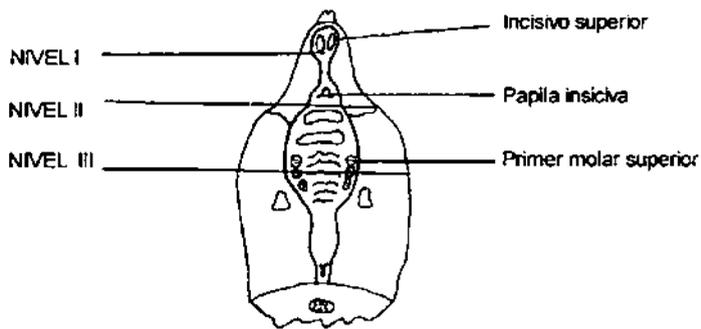


Fig.3 Esquema del techo de la boca de la boca de la rata, mostrando las marcas para la disección en tres niveles (Boorman y cols. 1990).

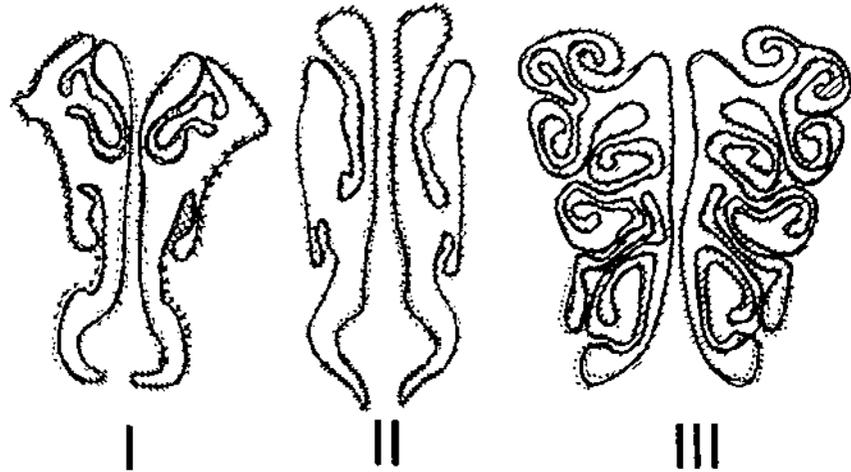
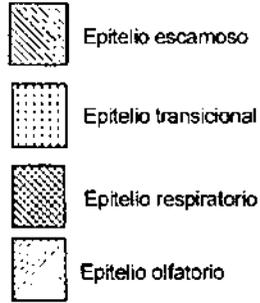


Fig. 4 Esquema del corte de los tres niveles (I, II y III) demostrando la localización de los principales tipos epiteliales presentes en cada nivel (Boorman y cols. 1990).

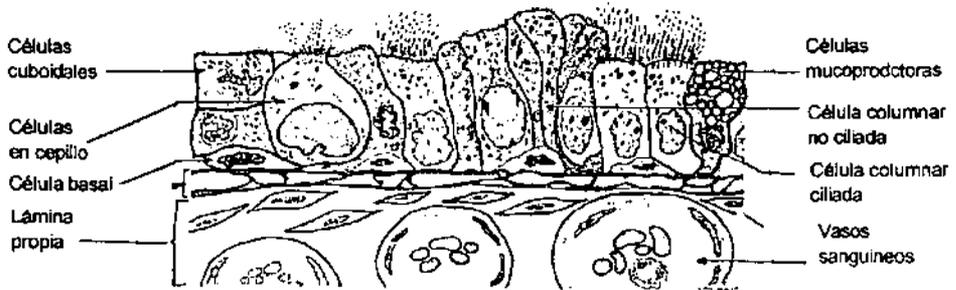


Figura 5. Esquema del epitelio respiratorio de la rata mostrando los seis tipos celulares (Boorman y cols. 1990)

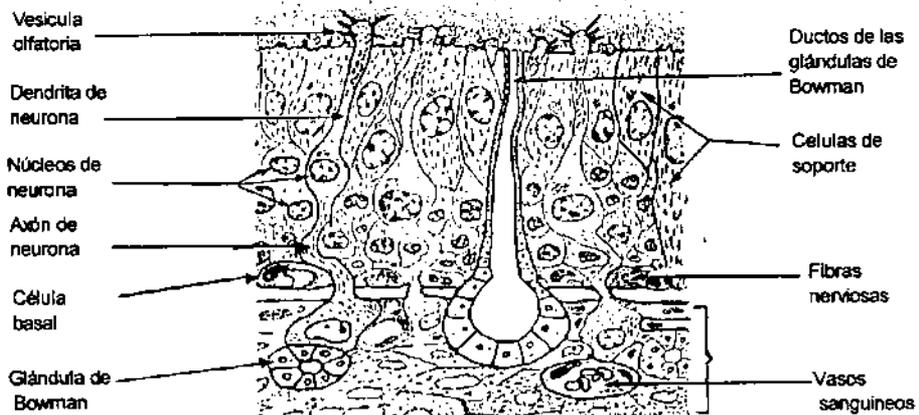


Fig.6 Esquema del epitelio olfatorio de la rata mostrandolos tres tipos celulares asi como las glándulas presentes en este. (Boorman y cols. 1990)

1.11 Tipos de Respuesta Celular al Medio

Las células tienen que adaptarse continuamente a los cambios de su ambiente haciéndolo de una manera fisiológica y morfológica, algunas de las alteraciones son:

Necrosis: Esta puede definirse como los cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en un tejido u órgano vivo y que se debe a la progresiva acción degradativa de las enzimas sobre las células lesionadas de forma letal.

Atrofia: Es la disminución del tamaño celular por pérdida de sustancias. (Robbins y cols. 1990)

Hipertrofia: Es el incremento del tamaño de las células y en consecuencia, del órgano correspondiente. (Robbins y cols. 1990)

Hiperplasia: Consiste en un incremento del número de células de un órgano o tejido, que puede tener también un mayor volumen. (Robbins y cols. 1990)

Displasia: Es una alteración del desarrollo, sin embargo para células epiteliales se les aplica este concepto cuando estas células han experimentado proliferación y alteraciones citológicas atípicas, que afecta al tamaño, forma y organización celular. (Robbins y cols 1990)

Metaplasia: Es un cambio reversible según el cual un tipo celular adulto (epitelial o mesenquimatoso) es sustituido por otro tipo celular adulto (Robbins y cols. 1990). Sin embargo para el epitelio de vías aéreas nasales normales se considera como una conversión de epitelio donde normalmente carece de células mucoides a epitelio con numerosas células mucoides a esta se le conoce como metaplasia mucosa (Harkema y cols 1997).

1.12 Inflamación

La inflamación puede considerarse como una serie compleja de acontecimientos que se desarrollan cuando el cuerpo es lesionado por agentes mecánicos o químicos o autodestructores (autoinmunizantes). Así la respuesta inflamatoria es una reacción sobre todo protectora y restauradora del cuerpo. Los signos clásicos de la inflamación son: hinchazón, enrojecimiento, calor, dolor y función alterada. La respuesta inflamatoria depende en forma crítica de vasos sanguíneos, células circulantes y líquidos intactos dentro de estas vías sanguíneas. En general se admiten tres etapas de inflamación: aguda, subaguda y crónica (Bellanti, 1986).

1.13 Inflamación de vías aéreas

La inflamación aguda responde y presenta características como vasodilatación con incremento de flujo sanguíneo, generación de exudado compuesto de proteínas plasmáticas y leucocitos principalmente neutrófilos siendo estas células mediadoras de inflamación. Los mediadores de la inflamación tienen diversas acciones en los "blancos" (células susceptibles de ser dañadas) de las vías aéreas (músculo liso, células epiteliales, células secretoras de moco o vasos bronquiales). Varios mediadores de la respuesta inflamatoria tienen la habilidad de aumentar la secreción mucosa de las vías aéreas (hipersecreción). La hipertrofia de las glándulas submucosas y la hiperplasia de las células en copa (mucoproducidas), constituyen un cambio importante en las vías aéreas; la hiperplasia de células en copa describen un incremento en el número de células en copa a largo de las vías aéreas. Los mecanismos que gobiernan el número de células en copa presentes en el estado normal o patológico, no están bien caracterizados; se conocen algunos irritantes de las vías aéreas que inducen hiperplasia de células en copa tales como humo de cigarro, dióxido de sulfuro y productos de neutrófilos. (Persson, 1994)

La hipersecreción mucosa está asociada con enfermedades respiratorias como el asma, bronquitis crónica, fibrosis quística e infección aguda, además la inflamación de las vías aéreas puede ser desencadenada por varios estímulos como el humo del tabaco, alérgenos, agentes infecciosos y contaminantes del aire.

1.13.1 Inflamación aguda

La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta desde unos minutos hasta varias horas o uno o dos días, y sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) así como la migración leucocitaria predominantemente de neutrófilos. (Robbins y cols 1990).

Muchas de las respuestas celulares de la inflamación están mediadas por factores químicos derivados de la acción del estímulo inflamatorio sobre el plasma o las células. Es importante recordar que ciertos estímulos como las toxinas, bacterias, etc; pueden desencadenar la elaboración de los mediadores inflamatorios. Las células que participan en la inflamación son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y plaquetas. Por otro lado los signos de la respuesta inflamatoria son inducidos por cambios de flujo y calibre vascular y exudación leucocitaria; cabe mencionar que un exudado es el escape de líquido, proteínas y células sanguíneas del sistema vascular hacia el tejido intersticial o cavidades corporales (Robbins y cols 1990).

Los cambios de flujo y calibre vascular que se observan son: 1) Vasoconstricción transitoria de las arteriolas que puede durar unos minutos, 2) Vasodilatación que primero afecta a las arteriolas y luego da lugar a la apertura de nuevos lechos vasculares en la zona, así se produce el incremento del flujo vascular, que es la causa fundamental de los cambios hemodinámicos precoces en la inflamación aguda y 3) menor velocidad en la circulación, consecuencia del incremento de la permeabilidad de la microvascularización. Esto provoca la concentración de hematíes en los pequeños vasos y aumento de la viscosidad de la sangre. En los cortes histológicos este fenómeno se refleja por la presencia de dilatación de los vasos

de pequeño calibre que contiene masas de hematíes y a este se le conoce como estasis. (Robbins y cols 1990).

A medida que se desarrolla la estasis, comienza a producirse el desplazamiento de los leucocitos principalmente neutrófilos hacia el endotelio vascular. Los leucocitos se adhieren al endotelio y poco después emigran, a través de la pared vascular, hacia el tejido intersticial a este proceso se le denomina emigración (Robbins y cols 1990).

El tiempo en que se producen estos acontecimientos es variable. Con estímulos leves, el estadio de estasis puede no ponerse de manifiesto hasta que han transcurrido de 15 a 30 minutos, en tanto que las lesiones más graves pueden instaurarse en pocos minutos. Además si el agente lesivo es difusible o si existe un gradiente de lesión, los vasos más próximos al estímulo muestran signos de rápidos cambios hemodinámicos, en tanto que los de la periferia tiene alteraciones leves.

El acúmulo de leucocitos (principalmente neutrófilos y monocitos) es el rasgo más importante de la reacción inflamatoria. Los leucocitos engloban y degradan las bacterias, inmunocomplejos, restos celulares necróticos y sus enzimas lisosómicas, las cuales contribuyen de otra forma en la respuesta defensiva. (Robbins y cols 1990).

1.13.2 Inflamación subaguda

Esta inflamación es una fase tardía de la respuesta inflamatoria aguda caracterizada por la acumulación de linfocitos y monocitos, así como tejido de granulación, este último es una proliferación de células endoteliales y fibroblastos y su principal función parece ser el depósito de colágena en la zona lesionada (Robbins y cols 1990).

1.13.3 Inflamación crónica

Esta inflamación se establece principalmente si la respuesta de inflamación subaguda no tuvo éxito y se caracteriza por que hay infiltración de células mononucleadas, principalmente macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, proliferación de fibroblastos y en muchos casos de pequeños vasos sanguíneos, incremento de tejido conjuntivo y destrucción tisular (Robbins y cols 1990).

1.14 Efectos a la Salud por Ozono

Estudios epidemiológicos demuestran que hay un aumento en la mortalidad por el ozono ya que provoca enfermedades cardiorrespiratorias, incremento de enfermedades respiratorias, exacerbación del asma, decremento de la función pulmonar entre otros síntomas. Las concentraciones comunmente encontradas en el aire causan molestias en el pecho, inhabilitación de respiración profunda, tos pronunciada, decremento en la capacidad vital (máximo de aire que puede ser exalado despues de una respiración profunda); asi como tambien incrementa la sensibilidad del hospedero para posteriores infecciones virales (Devlin y cols.1997).

Por otro lado estudios histopatológicos demostraron que las personas que viven en la Ciudad de México con altas concentraciones de ozono estan más lesionados en la mucosa nasal que las personas de edades similares que viven en areas rurales de México con poca contaminación (Calderón y cols. 1992).

La información que hay con respecto a la salud y el ozono es aún insuficiente para dar una conclusión definitiva. Estudios de inhalación con animales muestran que los niveles de ozono que se presentan actualmente en areas urbanas son suficientes para causar el envejecimiento prematuro de los pulmones, asi como tambien inflamación en vias respiratorias altas; también este gas reduce la habilidad que tiene el sistema respiratorio para remover particulas extrañas (Lacy, 1993).

Aunque el ozono puede dañar directamente proteínas y lípidos de las células del tracto respiratorio, la citotoxicidad del ozono se debe principalmente a los radicales libres² formados cuando el ozono ataca a las biomoléculas. Los radicales libres pueden dañar células pulmonares como macrófagos y células epiteliales, iniciando una cascada de reacciones que resultan en daño pulmonar, inflamación y cambios en la capacidad de defensa del hospedero (Devlin y cols. 1997).

² Las moléculas estables tienen electrones que estan pareados , pero si una molécula tiene un electron que no esta pareado (radical libre) esta es inestable y reactiva. (Lin.J. 1994).

Un estudio ha demostrado que la exposición a contaminación atmosférica urbana con altas concentraciones de ozono induce la formación de una sola hebra de DNA que se rompe en un sitio alcalí labil en células nasales y leucocitos. El ozono es un oxidante que al ser inhalado interactua con una gran variedad de moléculas del epitelio y este puede producir una cascada de reacciones por radicales libres que dañan la integridad genética y a relativas altas concentraciones la reacción puede causar daño extensivo en el DNA como rompimiento de hebras de DNA. Se ha encontrado que las células nasales exhiben un alto daño al DNA por exposición a contaminantes. (Valverde y cols, 1997).

1.15 Efectos del ozono en modelos experimentales

Las lesiones encontradas en el primate *Macaca radiata* por exposición a concentraciones ambientales, fueron confinadas a la superficie del epitelio en el pasaje nasal proximal y se caracterizaron por un marcado incremento de células mucosas en el epitelio transicional (Harkema y cols. 1987).

En ratas expuestas a 0.5 a 1.0 ppm de ozono presentan una marcada metaplasia de células mucosas con numerosas células mucoides (hiperplasia) y cantidades conspicuas de mucosustancias intraepiteliales en vías aereas altas asi como un infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia indicando un daño celular persistente, las lesiones antes mencionadas pueden alterar la función normal mucociliar, un mecanismo de defensa de vías aereas altas a la inhalación de xenobióticos (Harkema y cols [b]. 1997).

En ratas se a observado que la hipersecreción en las vías aereas nasales es producida por una metaplasia mucoide en el epitelio nasal que se da por la presencia de diversos contaminantes, tales como dióxido de sulfuro, humo de cigarro etc, esta secreción se dan por las altas dosis y el largo periodo a la que esta expuesta (Gordon y cols. 1996).

1.16 Interacción Celular con el Ozono

El ozono es el más potente oxidante en el "smog" es un gas que reacciona con moléculas orgánicas como los hidrocarburos. De cualquier manera el ozono puede ordenarse en moléculas de reactividad variable que puede pasar a través de los tejidos de las vías respiratorias llegando hasta el pulmón. (Pryor, 1993).

El ozono es de vida corta. Por lo que propone que el daño causado por ozono es por un efecto de cascada, es decir la reacción del ozono con el tejido más accesible puede producir agentes tóxicos que tienen un promedio de vida más larga que el ozono, por lo tanto estos agentes tóxicos pueden difundirse causando daño profundo la mayoría de las veces a nivel de pulmón.

La citotoxicidad del ozono es debido principalmente a los radicales libres formados cuando el ozono ataca a biomoléculas. Los radicales libres pueden dañar permanentemente a las células pulmonares, como macrófagos y células epiteliales iniciando toda una cascada de reacciones que dan como resultado un daño al pulmón, inflamación y cambios en la capacidad de defensa del hospedero (Devlin y cols. 1997).

Además se considera que hay tres factores principales que determinan el camino por el cual el ozono selecciona las moléculas para reaccionar, y penetrar alrededor del tejido de conducción aérea; la primera es la reactividad intrínseca con el ozono de cada especie, la segunda es la accesibilidad de cada individuo. El tercer factor es la característica arquitectónica del microambiente en el que reside el "blanco" molecular; es decir, se puede reducir o aumentar la reacción según la solución, estabilidad termodinámica o alguna característica que perdure en el medio (Pryor, 1993).

Cabe mencionar que el aire contaminado contiene muchos otros tóxicos como el ácido sulfúrico o ácidos formados de óxido nítrico que pueden acidificar el microambiente donde va a reaccionar el ozono (Pryor, 1993)

2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

La Ciudad de México esta gravemente afectada por la contaminación atmosférica, principalmente por el ozono que provoca un alto indice de enfermedades respiratorias tanto de vias altas como de vias bajas ya que es uno de los contaminantes que rebasa en mas tiempo y concentración la norma mexicana de calidad del aire; por lo que el presente trabajo surge como una necesidad de conocimiento del efecto del ozono en el sistema respiratorio, principalmente en la nariz que es la primer ruta de entrada del ozono y por lo tanto donde inicialmente va interactuar, provocando alteraciones en el epitelio nasal. Diferentes estudios se han realizado con respecto a este tema en humanos, pero este trabajo en particular se basó en un modelo experimental basado en ratas de cepa Wistar que tienen una anatomía, fisiología e histología semejante al humano.

La concentración utilizada en el trabajo es mucho más alta que las referidas en las contingencias ambientales de la Ciudad de México, ya que se necesita primero saber cuales son las alteraciones provocadas por ozono en una exposición aguda, siendo este el objetivo principal; ayudando estos resultados para estudios posteriores que se realicen con una exposición crónica a ozono, que es a lo que normalmente se expone un habitante de la Ciudad de México.

3. HIPOTESIS

Sí el epitelio nasal es el primer sitio de contacto con el ozono (O₃) , entonces será factible encontrar alteraciones morfológicas a este nivel por la exposición al gas mencionado.

4. OBJETIVO GENERAL

* Identificar alteraciones morfológicas en el epitelio nasal despues de una exposición aguda a ozono en rata.

5. OBJETIVO PARTICULAR

* Caracterizar los cambios en las mucoproteínas después de la exposición con tinciones especiales.

3. HIPOTESIS

Si el epitelio nasal es el primer sitio de contacto con el ozono (O₃) , entonces será factible encontrar alteraciones morfológicas a este nivel por la exposición al gas mencionado.

4. OBJETIVO GENERAL

* Identificar alteraciones morfológicas en el epitelio nasal despues de una exposición aguda a ozono en rata.

5. OBJETIVO PARTICULAR

* Caracterizar los cambios en las mucoproteínas después de la exposición con tinciones especiales.

3. HIPOTESIS

Si el epitelio nasal es el primer sitio de contacto con el ozono (O_3), entonces será factible encontrar alteraciones morfológicas a este nivel por la exposición al gas mencionado.

4. OBJETIVO GENERAL

* Identificar alteraciones morfológicas en el epitelio nasal después de una exposición aguda a ozono en rata.

5. OBJETIVO PARTICULAR

* Caracterizar los cambios en las mucoproteínas después de la exposición con tinciones especiales.

6. MATERIAL Y METODO

6.1 Animales e inhalación

Se utilizaron Ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 200 y 250 gramos, libres de enfermedades y/o patógenos que se mantuvieron en un cuarto limpio.

Se realizó el experimento con tres grupos (Tabla A.), para el grupo I que fue el control se introdujeron 8 ratas en un cámara de acrílico de 53 x 42 cm con libre acceso a comida y agua y se dejaron 4 horas inhalando aire filtrado, después de este tiempo se cambiaron a otra caja durante 2 horas y después se sacrificaron inmediatamente.

Para el grupo II se introdujeron 6 ratas a una cámara de acrílico con un difusor conectado a un generador de ozono Guimex cuantificando la concentración de ozono en un monitor de PCI & Control System Ozone Monitor que fluctuaba entre 1.0 a 1.5 ppm de O₃ (promedio de 1.25), estas ratas se dejaron inhalando ozono durante 4 horas después de este tiempo se cambiaron a otro lugar sin ozono dejándose ahí 2 horas y se sacrificaron inmediatamente .

Para el grupo III formado por 4 ratas se siguió el mismo procedimiento que para el primer grupo experimental pero para este grupo una vez que terminaron las 4 horas de exposición se pasaron a otra caja pero sin ozono durante 15 días, después de este tiempo se sacrificaron.

GRUPO	EXPOSICION A:	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	SACRIFICIO POSTEXPOSICIÓN
Control (I)	Aire	4 horas	2 horas
Agudo (II)	Ozono(\pm 1 ppm)	4 horas	2 horas
Agudo (III)	Ozono(\pm 1 ppm)	4 horas	15 días

Tabla A. Tiempo de exposición a O₃ y sacrificio postexposición a O₃ .

6.2 Técnica de sacrificio

Las ratas se anestesiaron con 40 mg por kg (dosis letal) de Pentobarbital sódico, una vez anestesiadas , se realizaron cortes a nivel torácico dejando al descubierto el corazón para realizar la perfusión, esta se realizó introduciendo la aguja del cateter por ventrículo izquierdo hasta la aorta y haciendo pasar 150 ml de solución salina al 9 % para lavar al organismo, una vez que paso toda la solución se hizo pasar 200 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 2 % y glutaraldehído con buffer de fosfatos .1 M a un pH de 7.4; Ya fijado el animal se procedió a la disección.

6.3 Disección

Una vez fijados los animales se decapitaron, y se le quitó la piel de la porción nasal para que se separara la maxila superior de la inferior, una vez que se obtuvo la maxila superior se le quitó el exceso de piel y se dejó descalcificar en ácido fórmico al 5 % durante una semana. Se tomó la maxila y se cortó en tres secciones: El corte para el primer bloque se realizo inmediatamente posterior a los dientes incisivos superiores, el corte para el segundo bloque se hizo inmediatamente despues de la papila incisiva y el último corte para el tercer bloque se hizo entre el primer y segundo molar superior (Boorman y cols.1990), estos cortes se realizaron para poder ubicar la zona por analizar. El análisis se baso en el segundo bloque, en el epitelio nasal (Figura 3).

6.4 Procesamiento para microscopia de luz

Se tomó cada uno de los bloques y se procesó con la técnica histológica habitual realizando cortes de 4 μ y utilizando la tinción de Hematoxilina-eosina (H-E), Acido peryodico-reactivo de Schiff (PASchiff) que tiñe moco neutro de color magenta y Azul alcian (AA) que tiñe moco ácido de color azul. Una vez listas las preparaciones se hicieron las observaciones en microscopia de luz, analizando las alteraciones producidas por O₃ en animales experimentales comparandolas con lo reportado en la literatura a nivel de epitelio nasal (Figura 5.). A las alteraciones encontradas se les califico como lesiones leve, moderada y severa 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla B).

6.5 Análisis de muestras

Las variables analizadas fueron: ausencia o presencia y de que grado se presentaban las células inflamatorias (PMN), de vasos sanguíneos y si estaban dilatados (Luz vaso), así como pérdida de cilios en la parte superior del septum nasal (Per. cili). (Gráfica 1)

También se analizaron las alteraciones que preceden a una hipersecreción como hiperplasia mucóide (HM) y finalmente si eran células PAS positivas y/o células AA positivas (Gráfica 2).

Grado de lesión	PMN	Luz vaso	Pérdida de cilios	Número de células * mucoprod.	Tinción PAS	Tinción AA
Normal	1 <	1 luz	cilios presente	1-3	+	+
Leve	5 <	2-3	2-3 s/c	3-5	+/-	+/-
Moderado	6-10	4-5	4-5 s/c	5-8	-	-
Severo	>10	>5	>5	>8	-	-

Tabla B. Muestra la escala que se tomo en cuenta para la calificación del grado de lesión de las alteraciones encontradas. Estos valores son tomados para un rango de 20 células epiteliales.* Los valores son tomados para un rango de 10 células epiteliales

7. RESULTADOS

De las alteraciones antes mencionadas, unas de ellas corresponden a un proceso inflamatorio, mientras que la otra parte de las alteraciones analizadas mostraron alteraciones que son provocadas por la hipersecreción, ambos tipos de alteraciones son una respuesta a la agresión por la presencia y la concentración del O_3 .

Como se había mencionado la principal zona de estudio fué en el segundo bloque; con respecto al control (4 horas de inhalación a aire filtrado y sacrificada 2 horas despues de esta inhalación) se observó que en general las características que se analizaron se presentaron sin alteración; pero si se encontraron neutrófilos de forma leve . La figura 5. muestra el corte del septum nasal de rata encontrado en la literatura.

Para el grupo expuesto agudamente (expuesto a 4 horas de O_3 y sacrificada 2 horas despues de la exposición) se observó que este presenta las alteraciones de forma severa, es decir presenta un aumento en número de vasos sanguíneos, se presentaron con más frecuencia los vasos dilatados de forma severa (fotomicrografía 1), hubo un gran aumento en el número de neutrófilos con respecto a los otros dos grupos llegando a ser severa (fotomicrografía 2), la pérdida de cilios, en este grupo fué moderada siendo mayor la pérdida en el grupo III (Tabla 1). Con respecto a las alteraciones relacionadas con la producción de moco como consecuencia de la hipersecreción se observo casi con el mismo patron, es decir se observaron mas puntos de hiperplasia mucóide llegando a ser moderado (fotomicrografía 3); asi tambien hubo un mayor número de glándulas presentandose de manera moderada, pero se presentaron menos glándulas dilatadas que en que en grupo III, de forma leve (fotomicrografía 4).

Con respecto al grupo III, expuesto subagudamente (4 horas de exposición a O₃ y sacrificio 15 días postexposición) se observó en general que disminuyeron las lesiones a una forma moderada. Así en este grupo III, si hay un aumento en el número de vasos pero un poco menos que en el grupo II, (fotomicrografía 5) de forma moderada, sucedió lo mismo para los vasos dilatados, también de forma moderada, los neutrófilos se presentaron en igual cantidad que en el grupo control de forma moderada (fotomicrografía 6), así como una mayor pérdida de cilios es decir de manera severa (fotomicrografía 6A) (Tabla 1). En cuanto a las alteraciones relacionadas con la producción de moco, la hiperplasia mucoide se observó en grado leve (fotomicrografía 6A y 7), el aumento en el número de glándulas llegó a ser moderado, la presencia de glándulas dilatadas también se presentan de forma moderada. (Tabla 2). La tabla y la gráfica 3 son el promedio del grado de lesión de las alteraciones morfológicas encontradas en la mucosa nasal que muestra un proceso inflamatorio, y puede observarse que el grupo más afectado es el grupo II y posteriormente el grupo III.

En cuanto a la tinción, en el grupo II y III se encontrarán células PAS+ (fotomicrografía 8 y 9 respectivamente) en igual cantidad; mientras que para la tinción AA, hubo menos células AA+ en el grupo II (fotomicrografía 10) y más células AA+ en el grupo III (fotomicrografía 11). Todo se analizó con respecto a la literatura (Tabla 2).

Alteración y grado de lesión , encontrada en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III .

Grupo	Neutrófilos (PMN)	Vasos dilatados	Pérdida de cilios
CONTROL (I)	1.5	1.12	1.62
AGUDO (II)	2.66	2.33	2.0
AGUDO (III)	1.5	2.0	2.25

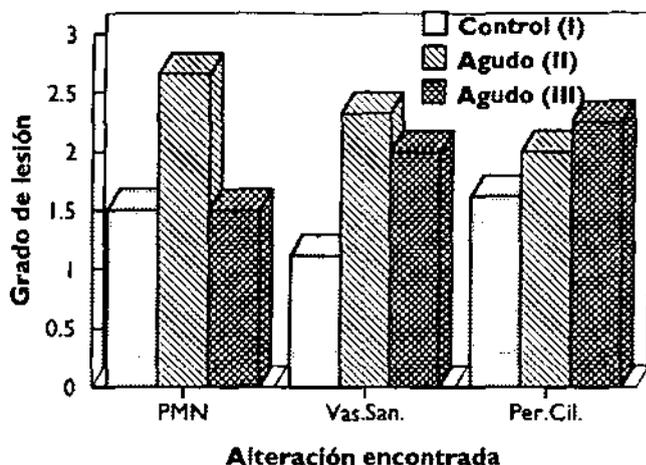
Tabla 1. - Muestra el nivel de lesión de la alteración encontrada en el epitelio nasal de cada grupo experimental. La escala para cuantificar al nivel es de 1, 2 y 3 (Leve, moderado y severo, respectivamente).

Grado de lesión de las alteraciones relacionadas con la producción de moco en el epitelio nasal de las ratas del grupo I, II y III.

Grupo	Hiperplasia Mucóide	PAS	AA
CONTROL (I)	0.25	0.75	0.62
AGUDO (II)	0.83	1.0	0.50
AGUDO (III)	0.50	1.0	0.75

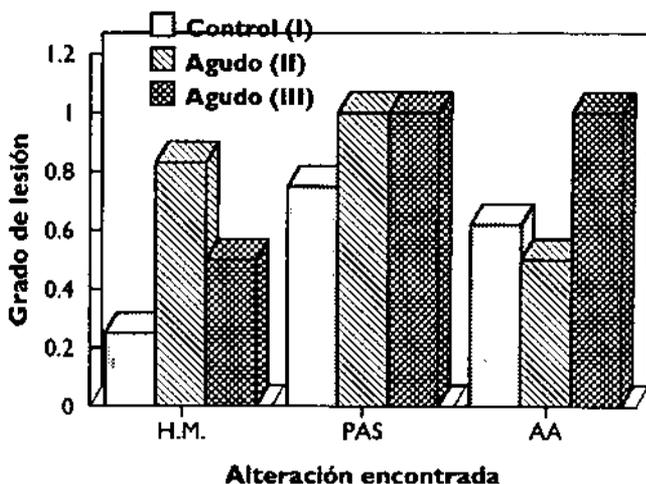
Tabla 2. - Muestra el nivel de lesión de la alteración relacionada con la producción de moco en el epitelio nasal de cada grupo experimental. La escala para cuantificar al nivel es de 1, 2 y 3 (Leve, moderado y severo, respectivamente).

Alteración y grado de lesión relacionada con inflamación encontrada en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III.



Gráfica 1. Muestra las alteraciones y el grado de estas, encontradas en la mucosa nasal, mostrando estas alteraciones un proceso inflamatorio. El grupo I solo inhaló aire filtrado, el grupo II inhaló 1.0 ppm de ozono 4 horas y se sacrificó 2 horas después, el grupo III inhaló 1.0 ppm de ozono 4 horas y se sacrificó 15 días después. PMN= Neutrófilos, Vas. San= Aumento de vasos sanguíneos y Per.Cil.= Pérdida de cilios. La escala es de leve, moderado y severo 1, 2 y 3 respectivamente.

Alteración y grado de lesión relacionada con la producción de moco encontrada en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III.



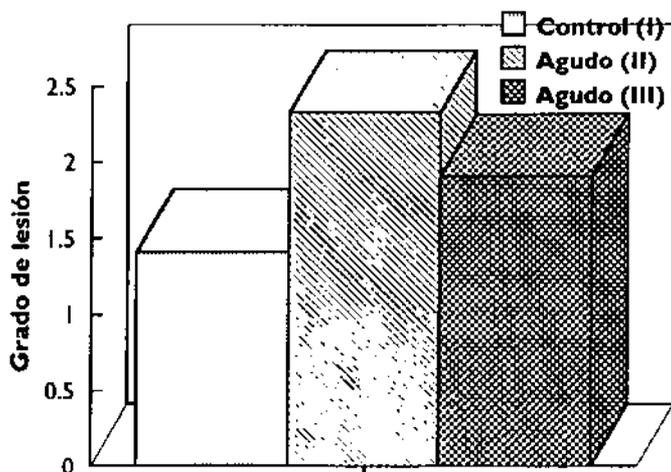
Gráfica 2. Muestra las alteraciones y el grado de estas, encontradas en la mucosa nasal, mostrando estas alteraciones una relación con la producción de moco. El grupo I solo inhaló aire filtrado, el grupo II inhaló 1.0 ppm de ozono 4 horas y se sacrificó 2 horas después, el grupo III inhaló 1.0 ppm de ozono 4 horas y se sacrificó 15 días después. H.M.= Hiperplasia mucóide, PAS= Tinción Pas-schiff positivo y AA= Tinción Azul alciano positivo. La escala es de leve, moderado y severo 1, 2 y 3 respectivamente.

Promedio de las alteraciones morfológicas relacionadas con inflamación encontradas en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III.

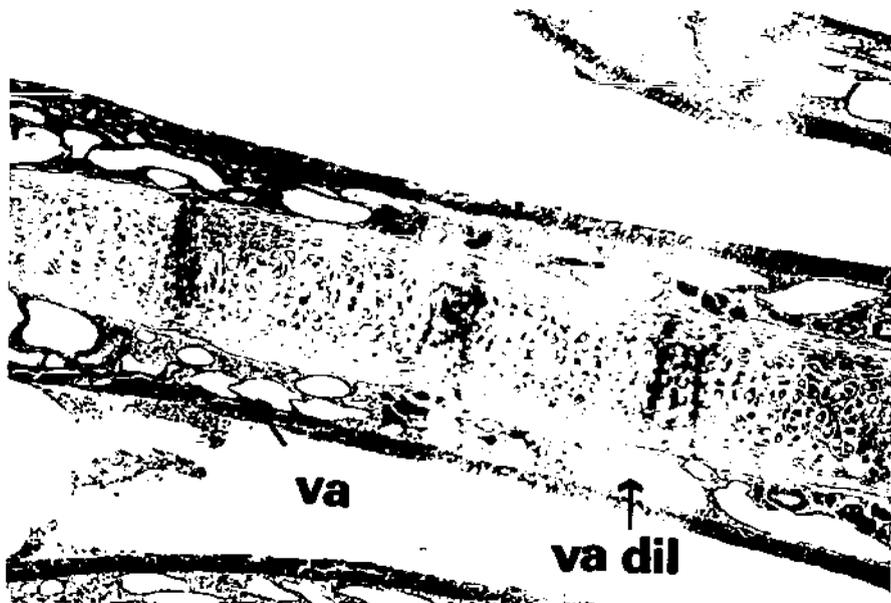
GRUPO	Promedio de l grado de alteraciones de los tres grupos.
Control (I)	1.41
Agudo (II)	2.33
Agudo (III)	1.91

Tabla 3. Promedio del nivel de lesión de las alteraciones morfológicas relacionadas con inflamación encontradas en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III. La escala para cuantificar al grado de lesión es de 1, 2 y 3 (Leve, moderado y severo respectivamente).

Promedio de las alteraciones morfológicas encontradas en el epitelio nasal de las ratas de los grupos I, II y III.



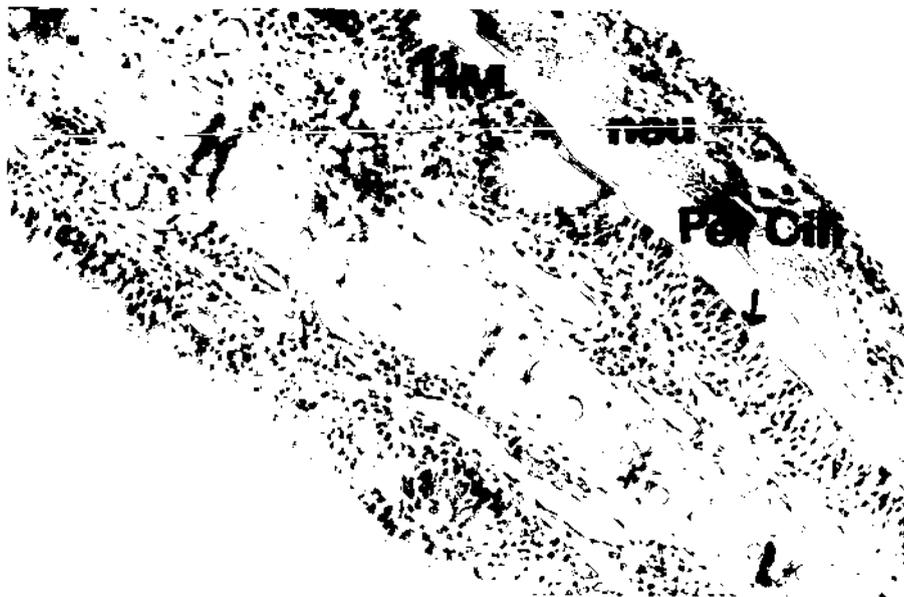
Gráfica 3. Muestra el promedio del grado de lesión de las alteraciones morfológicas encontradas en la mucosa nasal que muestran un proceso inflamatorio.



Fotomicrografía 1 . Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 2 horas después. Se aprecia el aumento de vasos sanguíneos (va) así como la dilatación (va dil) de estos. H-E, 40X



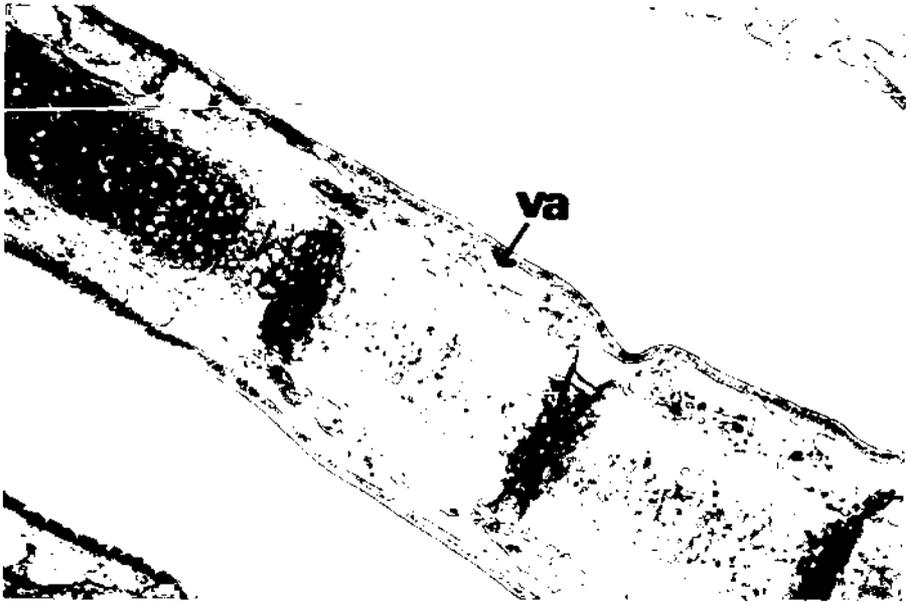
Fotomicrografía 2 . Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃, sacrificada 2 horas después y se observa que hay un gran aumento de Neutrófilos (Neu) y una hiperplasia de células mucoproductoras (HM). PASchiff, 250X



Fotomicrografia 3. Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃, sacrificada 2 horas despues. esta muestra la hiperplasia mucoide (HM) con contenido mucoso en una de estas, hay presencia de Neutrófilos (Neu). También hay pérdida de cilios de un lado del epitelio (Per.Cili.). PASchiff, 250X



Fotomicrografia 4. Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃, sacrificada 2 horas después durante 4 horas. Se observa un gran aumento de glándulas (Gla) no dilatadas que se tiñen de magenta, por la técnica de tinción . PASchiff, 40X.



Fotomicrografía 5. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. Se observa que disminuye el número de vasos y la dilatación de estos. PASchiff, 40X.



Fotomicrografía 6. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. Se observan neutrófilos en menor cantidad que en el grupo II, hiperplasia poco evidente, pérdida de cilios, con algunas glándulas dilatadas. PASchiff. 250X.



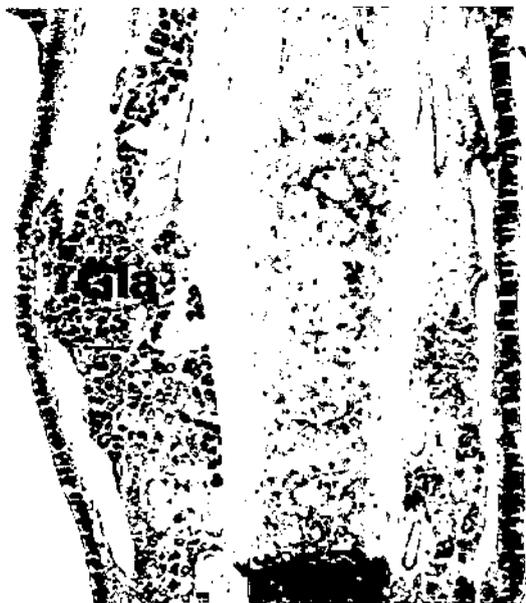
Fotomicrografía 6A. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. Hay total pérdida de cilios (Per.Cili). PASchiff, 250X.



Fotomicrografía 7. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. Hiperplasia (HM) en grado leve menor que el grupo II así como menor número de glándulas (Gla). PASchiff, 250X.



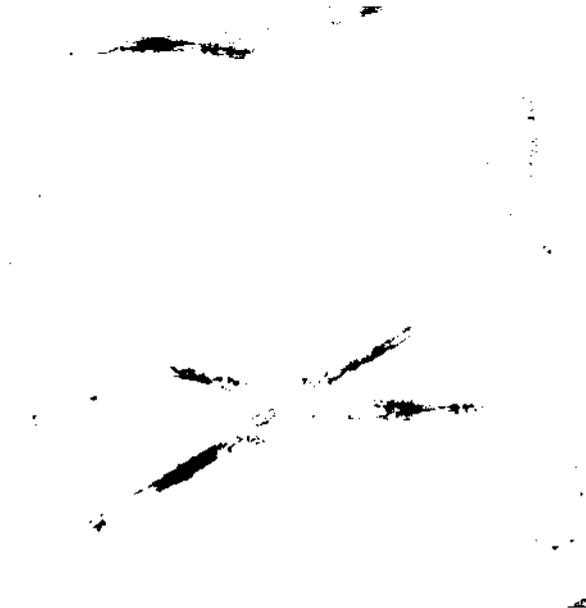
Fotomicrografía 8. Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 2 horas después. La tinción PASchiff es muy evidente en las glándulas así como en la Microfotografía 10 del grupo III. La tinción para ambos grupos es semejante, estas microfotografías se muestran para hacer la diferencia con la tinción de Azul Alciano. 100X.



Fotomicrografía 9. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. La tinción PASchiff es muy evidente en las glándulas así como en la Microfotografía 9 del grupo II, en ambas se tinte de color magenta. 100X.

Gla

Fotomicrografía 10. Corte de septum nasal de una rata del grupo II expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 2 horas después. Para este tejido se utilizó la tinción Azul Alciano la cual es negativa. 100X.



Fotomicrografía 11. Corte de septum nasal de una rata del grupo III expuesta a 1.25 ppm a O₃ durante 4 horas y sacrificada 15 días después. La tinción utilizada es Azul Alciano y es positiva (AA+). Lo que no sucedió para las ratas del grupo II. 100X

8. DISCUSION

Estudios relacionados con el tema se han llevado a cabo en otras especies y por razones obvias en el hombre son escasos. La rata se ha utilizado en modelos de exposición inhalada para otras sustancias, lo que permite comparar los cambios del presente trabajo con los otros reportados en la literatura. Hay estudios que refieren el parecido de la cavidad nasal de la rata con la del ser humano (Reznick,1990), lo que permite utilizarla como modelo comparable con el hombre. Estudios previos refieren que la exposición a ozono induce inflamación con cambios más evidentes en la zona de transición (Harkema,1987). En está se puede apreciar tambien metaplasia de células secretoras y en la zona anterior de la cavidad nasal, pérdida de cilios.

Los mamíferos estudiados presentan cuatro regiones epiteliales: epitelio escamoso estratificado (EE), epitelio respiratorio pseudoestratificado (ER), epitelio transicional cuboidal no ciliado, (ET) ubicado entre el EE y ER y finalmente en el epitelio olfatorio (EO) (Harkema, 1990). Asi los cambios morfológicos encontrados en este trabajo son evidentes ya que cambia la forma y distribución de las células epiteliales.

Como se esperaba, en los animales control (Grupo I) no se presentaron cambios en el epitelio nasal. Se apreció la presencia de algunos neutrófilos, semejante en la cantidad a los de los otros dos grupos cambio que es factible se deba a las condiciones asépticas en que se manejan estos animales en el bioterio, además de que aún en bioterio están inhalando el aire contaminado de la Ciudad de México que no solo está contaminado con ozono sino que con otros contaminantes, lo que nos lleva a tomar como control la histología de un individuo sano reportado en la literatura (Boorman y cols. 1990).

En el grupo II que estuvo expuesto 4 horas a 1.25 ppm de O₃ y se sacrificó 2 horas postexposición, los cambios inflamatorios fueron muy evidentes apreciándose: Dilatación capilar, mayor cantidad de leucocitos (PMN), pérdida ciliar e hiperplasia mucoide y los ductos glandulares submucosos se apreciarón dilatados;

Estos cambios no son específicos para la exposición al ozono ya que cambios similares se reportan en la exposición inhalada a otros gases irritantes (Harkema (a),1997, Hotchkiss,1991) pero sí podemos decir que estos cambios son propiciados por la exposición a ozono . Estos cambios son reversibles lo que permitirá la restauración de la función de las células ciliadas. En dos de los animales de este grupo la lesión fué tan severa que la membrana basal quedo desnuda, lo que posiblemente no lleve a la reparación hacia la estructura normal si no a la formación de una cicatriz que altera la funcionalidad local. Por otro lado, se aprecio un aumento en la cantidad y en la producción de moco, mismo que cambió de AA+ a mayor cantidad de PAS+. Este cambio pudo deberse a una modificación necesaria en el pH del moco que responde a la agresión del ozono tratando de diluir su concentración ya que es en medios ácidos donde reacciona con mayor facilidad (Pryor, 1993) y amortigua los cambios de pH de micro-ambiente nasal, cabe recordar ademas que en el moco hay presencia de antioxidantes (Harkema y cols. 1997), mismos que son efectivos en combatir a los radicales libres generados por la interacción del ozono con los lípidos de las membranas celulares.

En el grupo III que estuvo expuesto 4 horas a 1.25 ppm de O₃ y se sacrificó 15 postexposición, en este grupo tambien se apreciarón cambios inflamatorios pero de menor cuantia que en el grupo anterior y las modificaciones en la afinidad tintorial de las células epiteliales no fué tan evidente como en la exposición del grupo II, lo que sugiere que los cambios en la calidad del moco, se debe a la presencia del ozono y a su concentración. Como se observó el grupo II es el más dañado y en el grupo III disminuyen los cambios, esto hace pensar que el epitelio se está recuperando (Harkema (a),1997, Hotchkiss,1991), después de 15 días,aunque no completamente, pero sí es reversible este daño causado por ozono.

En el caso de la exposición que tenemos en la Ciudad de México hay una mezcla de efectos: durante las contingencias ambientales, exposición aguda, alternada con exposición crónica a concentraciones en promedio de 0.170 ppm de ozono (RAMA 1996-1997), durante varias horas, casi todos los días de la semana. Esta exposición debe condicionar cambios en la mucosa nasal que debe llevar a la pérdida parcial o total de su función, lo que permitirá que aire no filtrado llegue a las profundidades de las vías respiratorias bajas.

Más estudios que evalúen los cambios, tanto en las vías altas como en las bajas son necesarios para entender las repercusiones que el daño del epitelio nasal tiene en el funcionamiento de las bajas.

9. CONCLUSIONES

* Como se ha demostrado en otros modelos el ozono es un agente muy irritante que produce cambios en la permeabilidad de los epitelios cuyo resultado es la inflamación.

* Una respuesta a esta agresión es el aumento en la cantidad de células mucoproducidas y en volumen de moco producido, así como las características químicas del mismo que cambia como respuesta a la agresión causada por el ozono.

* Estudios que incluyan vías altas y bajas son necesarios para entender mejor el fenómeno, así como, modelos que incluyan exposición crónica a las dosis a las que la población está actualmente sometida.

* El estudio de los efectos del ozono, aún es necesario ya que hay muchos cambios por explicar y que por lo tanto no pueden ser prevenidos.

En el caso de la exposición que tenemos en la Ciudad de México hay una mezcla de efectos: durante las contingencias ambientales, exposición aguda, alternada con exposición crónica a concentraciones en promedio de 0.170 ppm de ozono (RAMA 1996-1997), durante varias horas, casi todos los días de la semana. Esta exposición debe condicionar cambios en la mucosa nasal que debe llevar a la pérdida parcial o total de su función, lo que permitirá que aire no filtrado llegue a las profundidades de las vías respiratorias bajas.

Más estudios que evalúen los cambios, tanto en las vías altas como en las bajas son necesarios para entender las repercusiones que el daño del epitelio nasal tiene en el funcionamiento de las bajas.

9. CONCLUSIONES

* Como se ha demostrado en otros modelos el ozono es un agente muy irritante que produce cambios en la permeabilidad de los epitelios cuyo resultado es la inflamación.

* Una respuesta a esta agresión es el aumento en la cantidad de células mucoproducidas y en volumen de moco producido, así como las características químicas del mismo que cambia como respuesta a la agresión causada por el ozono.

* Estudios que incluyan vías altas y bajas son necesarios para entender mejor el fenómeno, así como, modelos que incluyan exposición crónica a las dosis a las que la población está actualmente sometida.

* El estudio de los efectos del ozono, aún es necesario ya que hay muchos cambios por explicar y que por lo tanto no pueden ser prevenidos.

10. BIBLIOGRAFIA

- Bellanti , J. 1986 . Inmunología . Interamericana . México . D.F: 662 pp.
- Boat T., Cheng P-W. and Warren M. In Takishima T.; Shimura S. eds. Airway Secretion : Biochemistry of Mucus. Lung Biology in Health and Disease. Series Dekker N.Y., 72: 217-282. 1994.
- Boorman G. , Morgan K. , Uriah L. , Montgomery Jr. , Mackenzie W. 1990. Pathology of the Fischer Rat. Academic Press Inc. San Diego California . 580 pp.
- Bravo H. , Perrín F. , Sosa R. , Torres R. Incremento de la contaminación atmosférica por Ozono en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM). Ingeniería ambiental . 1(1): 8-14. Enero-febrero 1988.
- Bravo H. , Sosa R. , Torres R .Ozono y lluvia ácida en la Ciudad de México. Ciencias . (22): 33-40. Abril 1991 .
- Basbaum C., Jany B., Takeuchi K, Tsuda T. and Tounier J-M. In Takishima T.; Shimura. Airway Secretion: Gene Expression in Airway Mucus-Secreting Cells. Lung Biology in Health and Disease. Series Dekker N.Y., 72: 315-324. 1994.
- Calderón L., Osorno A., Bravo H., Barrios R. and Delgado R. Histopatologic Changes of The Nasal Mucosa in SouthWest Metropolitan México City Inhabitants. Am. J. Pathol. 140: 225-232.
- Chul K. Airway Secretion: Epithelial Goblet Cell Secretión. Lung Biology in Health and Disease. Series Dekker N.Y., 72: 433-449. 1994.
- Devlin R. , Raub J. , Folinsbee L. Health Effects of Ozone . Science & Medicine. 8-17 , May/june 1997
- Gardner, Gray y O'Rahilly R. 1986. Anatomía de Gardner. Interamericana-Mc Graw-Hill. México, D.F. 928 pp.
- Godish, T. 1991. Air Quality. Lewis. Chesea, Michigan. 422 pp.
- Gordon T; Nadziejko C; Plant M; Rodger W; Pon D; One-Month Exposure To Inhaled Endotoxin Produces A Dose-Dependent Increase In Stored Mucosubstances In Rat Intrapulmonary Airways. Experimental Lung Research, 22:509-523, 1996.

Gutierrez J., Trejo O., Camacho S., Castillo R., Cruz S. y Castañeda J. 1997. Distrito Federal. Educación ambiental. Caminos Ecológicos. Limusa. México D.F. 199 pp.

Harkema J. Comparative Pathology of the Nasal Mucosa in Laboratory Animals Exposed to Inhaled Irritants. Environmental Health Perspectives . 85: 231-238 (1990).

(a) Harkema J. , Barr E. , Hotchkiss J. Responses of Rat Nasal Epithelium to Short- and Long- Term Exposures of Ozone: Image Analysis of Epithelial Injury , Adaptation and Repair. Microscopy Research and Technique. 36: 276-286 (1997).

(b) Harkema J., Hotchkiss J., and Griffith W. Mucous Cell Metaplasia in Rat Nasal Epithelium after a 20 month Exposure to Ozone: A Morphometric Study of Epithelial Differentiation. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16:521-530 (1997).

Harkema J., Plopper C., Hyde D., St. George J., and Dungworth D. Response of the Macaque Nasal Epithelium to Ambient Levels of Ozone: A Morphologic and Morphometric Study of the Transitional and Respiratory Epithelium. Am. J. Pathol., 128: 29-44, 1987.

Hotchkiss J., Harkema J. and henderson F. Ozone-Induced Nasal Epithelial Hiperplasia and Secretory Metaplasia in rats. Experimental Lung Research. 15:589-600 (1991).

Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables . (I.M.R.N.R.). La contaminación atmosférica en la cuenca del Valle de México. XXV serie de mesas redondas . México , D.F.1986 .

Lacy R. 1993 . La calidad del aire en el Valle de México . Colegio de México . México , D.F. 88 pp.

Legorreta J. La grave contaminación atmosférica de la Ciudad de México. Ciencias. (22): 55-61. Abril 1991.

Lin D. 1994. Free Radicals and Disease Prevention. Keats Publishing Inc. New Canaan, Connecticut. 79 pp.

Llera, E. 1984. Temas para un futuro biólogo. UNAM. México, D.F. 569 pp.

Monteiro N. , Popp J. Ultraestructural Caracterización of the Nasal Respiratory Epithelium in the Rat . The American Journal of Anatomy . 169:31-43 . 1984.

Morgan K., Monticello T. Airflow, Gas Deposition, and Lesion Distribution in the Nasal Passages. Perspectives. 88: 209-218 (1990).

Organizacion Metereológica Mundial (O.M.M.) . La cambiante capa de Ozono. Ed. Bojkov . 1995 . 32 pp.

Persson C., in Takishima T.; Shimura. Airway Secretion: Airway Mucosal Exudation of Plasma. Lung Biology in Health and Disease. Series Dekker N.Y., 72: 451-467. 1994.

Pon D.J., van Staden J., Rodger W. Hypertrophic and Hiperplastic Changes of Mucus-secreting Epithelial Cells in Rats Airways: Assessment Using a Novel, Rapid and Simple Technique. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 10: 625-634. (1994).

Pryor W. Ozone in all its reactive splendor. J. Lab. Clin. Med. 122:483-6 (1993).

RAMA. 1996-1997. Reporte de la calidad del aire en en la Zona Metropolitana. www.df.gob.mx

Reznick G. Comparative Anatomy, Physiology and Function of the Upper Respiratory Tract. Environmental Health Perspectives . 85: 171-176 (1990) .

Robbins S. , Cotran R. 1990, Kumar V. Patología estructural y funcional .Mc Graw-hill - Interamericana de España . Madrid , España .

Ross M , Romrell L. y Kaye G. 1997 . Histología .-Texto y Atlas color. Médica Panamericana . México , D.F. 817 pp.

Stevens A. , Lowe J. 1995. Texto y Atlas de Histología . Mosby . Madrid , España. 378 pp.

Tortora G. , Anagnostakos N. 1993 . Principios de Anatomía y Fisiología . Harla. México , D. F. 1206 pp.

Uraih L. , Maronpot R. Normal Histology of the Nasal Cavity and Application of Special Techniques .Environmental Health Perspectives . 85: 187-208 . 1990.

Valverde M., López MC., López I., Sanchez I., Fortoul T., Ostrosky-Wegman P., and Rojas E. DNA Damage in Leukocytes and Bucal and Nasal Epithelial Cells of Individuals Exposed To Air Pollution in Mexico City. Environmental and Molecular Mutagenesis. 30: 14-152 (1997) .

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA