

00346

13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y POTENCIAL PRO-
INFLAMATORIO DE LAS AEROPARTÍCULAS DE LA CIUDAD
DE MÉXICO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)
P E S E N T A:
LETICIA MARTÍNEZ ROMERO

298188

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la **Dra. Irma Aurora Rosas Pérez** y a la **Dra. Claudia María García Cuellar** por haber aceptado la dirección de esta tesis, por las enseñanzas recibidas, la confianza y el apoyo depositados en mí durante la realización de la misma.

Al **Dr. Alvaro Roman Osornio Vargas** quien se interesó por mi trabajo de manera especial y al que dedicó gran parte de su tiempo. Gracias por su orientación y palabras de aliento.

Al resto de los miembros del jurado:

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Dra. Annie Pardo Semo

M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos

M. en C. Eva Salinas Cortes

Por enriquecer este trabajo con sus comentarios y por el tiempo que me dedicaron.

Agradezco:

Al **Centro de Ciencias de la Atmósfera** por ser la institución que me adopto hace 10 años y por facilitarme espacio e infraestructura desde entonces. Al Dr. Fernando García director de la misma.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** por brindarme sus instalaciones y equipo, donde realizar el trabajo experimental de esta tesis. Al Dr. Alfonso Dueñas, jefe de Investigación Básica del INCan por permitir mi estancia en esta institución.

Al programa **CONSERVA 1999** por haber financiado este proyecto.

A la **Dirección General de Estudios de Posgrado** de la Facultad de Ciencias por otorgarme una beca durante la realización de la tesis. Al Mtro. Juan Manuel Rodríguez Chavez responsable del subcomite de becas.

Al Dr. **Sergio Ponce de León Rosales** por su asesoría durante el análisis estadístico.

A **Eva Salinas** amiga, compañera y cómplice incondicional.

A mis compañeras de aula **Hilda, Noemi, Tony e Ivonne** por compartir e impulsar esta necesidad de aprender.

A las personas que conocí en el INCAN y aligeraron mi trabajo: **Enrique, Caty, Lucy, Paty, Adela, Rafa, Erick y Ernesto**.

A toda **mi familia** (que es bastante numerosa) por su confianza y cariño.

A todas esas personas que me apoyaron y que no menciono porque es imposible numerarlas, pero que ellas y yo sabemos de su participación, mil gracias.

INDICE	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	
• Contaminación atmosférica	6
• Generalidades de PM ₁₀	8
• Efectos celulares de las partículas	9
• Inducción de procesos inflamatorios por partículas	10
• Daño a material genético	13
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
ÁREA DE ESTUDIO	20
MÉTODOS	24
RESULTADOS	
• Citotoxicidad de las partículas	38
• Evaluación de los niveles de transcripción del RNAm para IL-6 y TNF α	43
• Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadantes	47
• Actividad celular citotóxica inducida por sobrenadantes de células estimuladas con PM ₁₀ en células L929	49
• Cuantificación de endotoxinas asociadas a las aeropartículas	50
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Aluminio
As	Arsénico
ATCC	American Type Culture Collection
C	Centro
Ca	Calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementario
CO	Monóxido de carbono
Cu	Cobre
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Mezcla de nucleótidos totales
ELISA	Ensayo inmunoenzimático indirecto
ENPr	Proteína neutralizante de endotoxina
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
Fe	Fierro
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HSP70	Proteínas de choque térmico de 70 kDa
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
ITS	Suplemento de insulina, transferrina y selenio
KCl	Cloruro de potasio
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>
LBP	Proteína de unión al LPS
LC50	Concentración letal al 50%

LPS	Lipopolisacarido
Mg	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófago 2
N	Norte
NF- κ β	Factor nuclear κ β
O ₂	Oxígeno molecular
Pb	Plomo
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGF-R α	Receptor α del PDGF
PM	Material particulado
PM ₁₀	Material particulado menor o igual de 10 μ m
PM _{2.5}	Material particulado menor o igual de 2.5 μ m
PST	Partículas suspendidas totales
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _t	Ácido ribonucleico total
ROFA	Partículas originadas de la combustión de aceite
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción Reversa de PCR
S	Azufre
S	Sur
SFB	Suero fetal bovino
Si	Silice
TBE	Tris-borato-EDTA
TGF β	Factor de crecimiento de timocitos β
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
UE	Unidades de endotoxinas
V	Vanadio

ZMCM

Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Zn

Zinc

RESUMEN.

Las actividades que continuamente se realizan en la Ciudad de México, inherentes a su crecimiento demográfico y urbano, han propiciado un incremento en gases y partículas que han afectado la calidad del aire. Numerosos estudios epidemiológicos proporcionan evidencia suficiente sobre la relación existente entre el material particulado y diversos padecimientos. Las aeropartículas están asociadas con un descenso en la función respiratoria, agravamiento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares preexistentes, alteración en los mecanismos de defensa y finalmente eventos de muerte prematura, sobre todo en un sector de la población sensible, representado por niños y ancianos. Aunque existe uniformidad de opiniones en cómo el tamaño de las aeropartículas determina su efecto nocivo, no se puede ignorar que su composición determina su acción tóxica. En ese sentido, la Ciudad de México ofrece la oportunidad de estudiar comparativamente diferencias en composición, efectos citotóxicos y pro-inflamatorios de las PM_{10} . En este estudio se evaluó la toxicidad de las partículas colectadas en tres zonas de la ciudad (norte, centro y sur) sobre una línea celular (J774A.1). Se encontró que las PM_{10} inducen un efecto citotóxico dependiente de la concentración y de la zona de colecta, dicho efecto fue mayor con las partículas del norte, que con las del centro y sur. Por otra parte, se evaluó la expresión (detectada por RT-PCR) y secreción (detectada por ELISA) de dos citocinas involucradas en el proceso inflamatorio, $TNF\alpha$ e IL-6. Después de la estimulación de células con PM_{10} no se observó diferencia en la expresión del gen $TNF\alpha$ a una concentración de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pero sí para IL-6. Sin embargo a 40 y $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, se observa una diferencia en la secreción de ambas citocinas dependiente de la concentración y de la zona de colecta. En este caso las PM_{10} de la zona centro fueron más potentes que las del norte y sur. Con esto podemos concluir que el efecto tóxico e inflamatorio producidos por las partículas son dos procesos independientes, en los cuales, las PM_{10} colectadas en el norte son más tóxicas, mientras que las del centro tienen un efecto inflamatorio mayor.

INTRODUCCIÓN.

Contaminación Atmosférica.

La Ciudad de México es una de las más contaminadas y pobladas en el mundo. El crecimiento industrial y el aumento de la mancha urbana, son factores que han provocado un impacto negativo en el ambiente. Producto de una expansión sin planeación, la tecnología y la infraestructura adecuada, la zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM) es habitada por casi 17.8 millones de personas (XII Censo General de Población y Vivienda 2000), en donde el subdesarrollo ha permitido que se combinen la contaminación de origen químico y biológico.

El problema de la contaminación del aire en la ZMCM se agrava por las características geográficas, topográficas y meteorológicas de la zona. La Ciudad se localiza a 2240 metros sobre el nivel del mar, en una cuenca lacustre rodeada de montañas de más de 3000 m de altura, características que le confieren un clima subtropical de altura. Se presenta una estación de lluvias de mayo a octubre y una estación de secas el resto del año. La temperatura anual oscila entre 5.3 y 26.5°C, con vientos dominantes en dirección noreste a suroeste. Durante los meses fríos del año (diciembre - febrero), se presentan frecuentes inversiones térmicas, combinadas con ausencia de viento y masas de aire polar continental que se prolongan por más de 24 horas, impidiendo la dispersión de los contaminantes debido a la estabilidad de las capas inferiores de la atmósfera. La altitud a la que se localiza la ciudad tiene como consecuencia una menor concentración de O₂, condición que altera la eficiencia del proceso de combustión,

generando mayores concentraciones de CO e hidrocarburos. La radiación lumínica elevada determinada por la latitud, favorece las reacciones para la formación de contaminantes fotoquímicos a partir de precursores como son el óxido de nitrógeno e hidrocarburos (Doran et al., 1998).

La ZMCM reúne una gran cantidad de contaminantes provenientes de fuentes naturales (suelos erosionados, secos y con escasa cubierta vegetal) y antropogénicas (industria y vehículos), generando un mosaico en cuanto al tipo y niveles de contaminantes, lo cuál desde el punto de vista de la salud, tiene gran importancia. Sin embargo, generalmente se trata el problema de la contaminación como un todo homogéneo, sin considerar las diferencias en mezclas, composición y niveles de contaminantes encontrados en las diferentes zonas de la ciudad. Por ejemplo, los habitantes del suroeste están expuestos de manera crónica a altos niveles de ozono, mientras que los que se localizan en el noreste se exponen a una mezcla aún no bien determinada de hidrocarburos, ozono, bióxido de azufre y altas concentraciones de material particulado (Castillejos, 1992).

Las partículas suspendidas en la atmósfera (aeropartículas) son la forma más visible de contaminación, en general se aplica el término de partículas suspendidas totales (PST) a una amplia variedad de sustancias químicas que existen como partículas discretas (líquidas o sólidas) que se distribuyen en un amplio intervalo de tamaños. Sin embargo, dada la importancia tóxica del material particulado menor o igual de $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) por su capacidad para penetrar en vías respiratorias inferiores (Bascom et al., 1996; EPA 1997) y a la tendencia de hacer más estrictos los controles para este contaminante, se ha postulado que calcular

emisiones de PST no tiene relevancia ni para protección de la salud ni para el establecimiento de políticas de control, por lo que actualmente se ha determinado cuantificar las emisiones de PM₁₀ (Inventario de Emisiones a la Atmósfera en la ZMVM, 1996).

Generalidades del PM₁₀.

El término PM₁₀ es un indicador de contaminación atmosférica, utilizado para definir una mezcla compleja de aeropartículas de origen natural y/o antropogénico menor o igual de 10 µm. El tamaño, composición química y otras propiedades físicas y biológicas dependen de la fuente de origen de las partículas, así como de los cambios a los que están sujetas durante su permanencia en la atmósfera y del sitio geográfico de colecta. En ambientes urbanos de países desarrollados las PM₁₀ provienen principalmente de la combustión (30 a 40%), tanto de fuentes móviles, como son los vehículos de gasolina o diesel, como de fuentes fijas en el caso de las industrias (Dreher et al., 1997), sin embargo en países en desarrollo, existe una mayor proporción de partículas biológicas y de origen geológico (Santos-Burgoa y Rojas-Bracho, 1992).

Para el caso de México, el inventario de emisiones a la atmósfera en la ZMCM (1996) reporta que el 18 % de las PM₁₀ provienen de la industria, el 26% de las emisiones son originadas por la circulación de vehículos automotores (COMETRAVI, 1997), y el 55% de las partículas son de origen geológico, caracterizado por la abundancia de Al, Si, Fe, Mg y Ca (Miranda et al., 2000). El 1% restante lo conforman las partículas originadas por los establecimientos o lugares donde se desarrollan actividades que de manera individual emiten

cantidades relativamente pequeñas de partículas, pero que en conjunto representan un aporte considerable, como son comercios, ambientes domésticos y de servicios.

Las PM_{10} por su diámetro aerodinámico se pueden clasificar en: **Ultrafinas** o nucleares, que incluye partículas menores de $0.1 \mu m$ de diámetro; **finas** o de acumulación, que incluye partículas entre 0.1 y $2.5 \mu m$ de diámetro y **gruesas**, que incluye partículas mayores a $2.5 \mu m$ y menores de $10 \mu m$.

El origen de las partículas finas y ultrafinas se debe a emisiones de procesos de combustión, o bien, por reacciones químicas atmosféricas. Generalmente están compuestas de carbono elemental y compuestos orgánicos (hidrocarburos poliaromáticos y productos de reacción fotoquímica), metales pesados, nitratos e iones amonio, ácidos y sales sulfatadas, componentes que le confieren acidez (Fortoul, 1996, Miranda et al., 2000). Por otra parte, la fracción gruesa es generada por erosión del suelo, desprendimiento de diversas fuentes de minerales insolubles (óxidos de silicio, de calcio, de magnesio, de hierro, etc.), carbonato de sodio y otras sales, así como partículas biológicas dentro de las que se incluyen bacterias, hongos, polen, algas, protozoarios, insectos y compuestos biogénicos, como proteínas, micotoxinas y endotoxinas bacterianas, entre otros (Suárez, 1991; Rosas et al., 1995, 2001; Lang, 1996,).

Efectos celulares inducidos por las aeropartículas.

Numerosos reportes epidemiológicos indican que la exposición a las aeropartículas se asocia con un incremento en la morbilidad y mortalidad, particularmente en niños y ancianos (Dockery et al., 1993; Schwartz, 1994;

Bascom 1996, Borja-Aburto et al., 1997, Samet et al., 2000), como consecuencia de un agravamiento de enfermedades respiratorias (Rosas et al., 1998) y cardiovasculares preexistentes. En un intento por describir el daño pulmonar causado por las aeropartículas, se han utilizado algunos estudios experimentales *in vitro* y modelos de exposición *in vivo*, en donde se ha demostrado una variedad de efectos en el pulmón resultado de la exposición a partículas. Básicamente su participación se puede dividir en el efecto de estas durante los procesos de inflamación y daño a material genético.

Inducción de procesos inflamatorios.

Desde los primeros estudios, Goldsmith y colaboradores (1998) hacen referencia a la capacidad de las aeropartículas ambientales para estimular la producción de oxidantes intracelulares en macrófagos alveolares, sin encontrar una relación entre la concentración de aeropartículas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los componentes principales responsables del estrés oxidativo se ubican generalmente en la fracción soluble, sin embargo, también se reporta que al hacer un análisis de partículas colectadas en días independientes, existen algunas muestras en donde la fracción insoluble posee la misma capacidad para inducir la producción de ROS. Debido a que en este estudio la producción de oxidantes fue inhibida con deferoxamina (aunque no completamente), se atribuye el efecto a los metales pesados principalmente Fe^{3+} y Cu^{2+} . La producción de oxidantes puede contribuir con los procesos de inflamación como respuesta a la inducción de ROS, metabolitos de nitrógeno, derivados de ácido araquidónico,

proteasas, enzimas lisosomales y citocinas proinflamatorias, resultados similares se han reportado en células mesoteliales (Ghio et al., 1992; Janssen et al., 1994).

Las aeropartículas participan también en la sobreexpresión de PDGF-R α en miofibroblastos de rata, a través de mecanismos dependientes e independientes de macrófagos. En el primer mecanismo, los componentes presentes en las partículas ambientales de la Ciudad de México, como son la endotoxina y los metales (probablemente vanadio) estimulan la liberación de IL-1 β en macrófagos expuestos, lo que a su vez dispara la señal para incrementar la expresión de receptores en miofibroblastos. En el segundo, los componentes mencionados actúan directamente sobre los miofibroblastos incrementando el número de receptores (Bonner et al., 1998).

Sin embargo, existen opiniones encontradas sobre el o los componentes de las aeropartículas responsables del efecto proinflamatorio, Carter y colaboradores (1997) quienes trabajaron con células epiteliales de bronquios (NHBE) de humanos expuestas a un modelo de partículas denominadas ROFA, reportan la inducción, tanto de la proteína como del RNAm de TNF, IL-6 e IL-8. La producción de citocinas fue bloqueada utilizando deferoxamina (antioxidante), por lo que se responsabilizó a los metales de dicha respuesta, principalmente al vanadio.

Otros estudios muestran que las aeropartículas ambientales son capaces de inducir directamente la producción de citocinas proinflamatorias (TNF, TNF α , IL-6, IL-1 y MIP-2) en macrófagos alveolares, tanto de humano como de rata. Se demostró que esta inducción puede ser parcialmente inhibida por polimixina B

(bloqueador de LPS) y no así por deferoxamina, lo que indica que el principal responsable de la inducción es la endotoxina asociada a las aeropartículas y no a los metales de transición (Becker et al., 1996; Dong et al., 1996). Más tarde, Monn y Becker (1999), establecen que la inducción de citocinas está asociada a la fracción soluble de PM₁₀ y no a PM_{2.5}, ya que se observa una producción de IL-6 e IL-8 veinte veces mayor con las PM₁₀. Nuevamente esta producción puede ser inhibida utilizando una proteína de unión al LPS (LBP).

Un hallazgo reciente se refiere al efecto que puede tener un tratamiento previo con LPS sobre la inducción de TNF, en macrófagos alveolares de humano y rata expuestos a partículas. Los resultados muestran que células tratadas con LPS tres horas antes de su exposición a partículas, se muestran más reactivas y amplifican la producción de TNF diez veces más. Nuevamente, este incremento está asociado con la fracción insoluble (Imrinch et al., 1999, 2000). Un efecto similar se puede observar en células epiteliales de pulmón de humano (NHBE y A549), en donde un tratamiento previo con TNF α tiene la capacidad de incrementar la respuesta celular, lo que sugiere que una respuesta inflamatoria puede ser potenciada después de la inhalación de aeropartículas (Carter et al., 1997; Stringer, 1998). Estudios en animales experimentales (modelos de ratas) revelan que la inhalación de aeropartículas disminuye los mecanismos de defensa pulmonar e incrementa las lesiones neoplásicas pulmonares (Kodavanti et al., 1997). Recientemente Su y colaboradores (2000) reportan que ratas expuestas por 3 y/o 72 horas a partículas ambientales muestran una clara inducción del gen de matrilisina, dando origen a una proteína activa (una metaloproteínasa de

matriz), revelando su participación en daño pulmonar agudo, debido a su capacidad para activar otras metaloproteínas latentes, así como de inactivar inhibidores de serin proteasas como α 1-antitripsina, amplificando así la actividad proteolítica general. También se identificó a los macrófagos alveolares como la fuente primaria de expresión de matrilisina por ensayos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. La matrilisina también tiene la capacidad de regular la activación de citocinas como son el $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TGF}\beta$, importantes reguladores del proceso de inflamación.

Daño a material genético.

Las aeropartículas pueden absorber sustancias orgánicas policíclicas del grupo de los benzopirenos, que le confieren la capacidad para inducir efectos mutagénicos. La utilización del ensayo de Ames (Maron and Ames, 1983), que consiste en exponer a una cepa de *Salmonella typhimurium* (TA98) a la fracción orgánica de las partículas, demostró que existe una mayor actividad mutagénica en PM_{10} con respecto a las PST, principalmente de aquellas partículas colectadas en la zona centro de la Ciudad de México (Villalobos, 1995).

Un estudio realizado por Lewtas y colaboradores (1997) demuestra la capacidad de las aeropartículas para generar aductos en DNA. En este estudio se comparó un ambiente ocupacional con concentraciones altas de $\text{PM}_{2.5}$ y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), contra concentraciones ambientales menores. Los resultados fueron que las exposiciones ambientales se asocian con un número mayor o igual de aductos que las exposiciones ocupacionales, debido quizá a una

saturación de la actividad enzimática, por lo que se concluye que no se deben realizar extrapolaciones sobre el efecto de concentraciones ocupacionales a ambientales porque se corre el riesgo de subestimar la respuesta.

Se ha reportado que las aeropartículas también tienen la capacidad de inducir apoptosis. Holian y colaboradores (1998) utilizando 3 técnicas diferentes: caracterización morfológica, detección de fragmentos de DNA unido a histonas por ELISA y formación de escaleras en DNA, llegaron a la conclusión de que concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de partículas urbanas son capaces de inducir apoptosis en macrófagos alveolares humanos, sin evidencia de necrosis. Asimismo incrementan la expresión de epítopes de superficie RFD1⁺ responsables de la transformación de los macrófagos hacia un estado de mayor activación.

El efecto genotóxico de las aeropartículas ha sido recientemente evaluado mediante la utilización de un ensayo de electroforesis en gel de células aisladas (SCG), denominado ensayo cometa, que permite evaluar el daño a DNA en diferentes poblaciones celulares. Alfaro (1999) reportó la inducción de cometas en una línea celular (Balb c) en confluencia que fue expuesta a bajas concentraciones de partículas (de 2.5 a 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), provenientes de diferentes zonas de esta ciudad. Al evaluar las longitudes de los cometas se pudo observar que partículas provenientes del norte y centro indujeron cometas más largos que las partículas del sur. Para las tres zonas se reportó que existe una relación dosis-respuesta en concentraciones bajas, la cuál desaparece paulatinamente a medida que las concentraciones se elevan.

Uno de los efectos más agudos de las aeropartículas es su potencial citotóxico, el cuál ha sido demostrado en diferentes líneas celulares en proliferación (Balb c, RLF, 34Lu, macrófagos alveolares, etc). También se concluye que células en confluencia son más resistentes al efecto de las partículas. Las concentraciones tóxicas están alrededor de los 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dependiendo del origen de la partícula (Becker et al., 1996; Holian et al., 1998; Alfaro, 1999).

En conclusión podemos suponer que un mecanismo para explicar los efectos de las aeropartículas urbanas en los fenómenos de morbilidad y mortalidad, implica las interacciones de éstas con los macrófagos alveolares. Estas células son centrales en la regulación de la respuesta inmune durante el desarrollo de la inflamación, y tienen un papel importante en el mecanismo inespecífico a través de la fagocitosis de materiales extraños, en este caso, partículas urbanas (Holian, 1998).

La activación de macrófagos con PM_{10} modifica la homeostasis del pulmón generando la producción de componentes del complemento, factores de crecimiento y mediadores de inflamación lipídicos (prostaglandinas) y proteicos (diversas citocinas). Estos últimos incrementan los niveles de factores hematológicos circulantes tales como el fibrinógeno, responsable del incremento en la viscosidad del plasma, originando la coagulación sanguínea y un incremento en la formación de trombos (HEI, 2000).

En el presente trabajo se seleccionaron dos de las citocinas pro-inflamatorias: el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$) e interleucina 6 (**IL-6**). El criterio que se siguió para su selección fue el papel que desempeñan en el proceso inflamatorio, el

TNF α ha sido descrito como una citocina que sirve como señal inicial en la estimulación directa de eventos en el tejido durante la respuesta inflamatoria. Por otro lado la interleucina 6 es una citocina de respuesta tardía con actividad pro y anti-inflamatoria, inducida principalmente por IL-1 y TNF α , y cuya función principal radica en la estimulación de hepatocitos para sintetizar proteínas de fase aguda y su capacidad para incrementar la producción de inmunoglobulinas (Herderson et al., 1996).

JUSTIFICACIÓN.

Se han reportado efectos asociados con la exposición a altas concentraciones de PM₁₀, como son cambios en la función respiratoria y cardiovascular, alteraciones del sistema inmune, daño en tejido pulmonar y muerte prematura entre otros (Dockery et al., 1993; Schwartz, 1994; Bascom 1996; Borja-Aburto et al., 1997; Samet et al., 2000). Existe poca información experimental sobre la asociación entre efectos y partículas, aunque este fenómeno se atribuye principalmente a la concentración y tamaño de las mismas. Sin embargo, recientemente (Mar et al., 2000) se ha considerado la composición de las partículas, ya que los daños que éstas inducen dependen de sus propiedades químicas, biológicas y físicas, así como de su lugar de procedencia, características en gran parte desconocidas, lo que dificulta la determinación del grado de toxicidad de las mismas (Bascom et al., 1996; Mar et al., 2000).

La Ciudad de México ofrece la oportunidad de realizar un estudio comparativo sobre la toxicidad de las partículas dependiendo de su composición. Esto es posible debido a que posee zonas con actividades y características particulares que la convierten en un mosaico de opciones. De lo anterior podemos considerar el área industrial de la zona norte, la zona centro donde la actividad principal es el comercio por lo que el tráfico vehicular es más denso (Salazar et al., 1992; Edgerton et al., 1999) y finalmente la zona sur considerada como habitacional. Aunado a esto, un estudio reciente revela que los niveles de PM₁₀ se han incrementado superando la norma de 150 µg/m³ (Falcon 1992; Castillejos y

Retama, 2001). Los niveles mayores se han encontrado principalmente en la zona norte y centro de la ciudad.

Con respecto al impacto de dicho incremento, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) reporta que la incidencia de enfermedades respiratorias ha aumentado, tanto en ancianos como en niños (INER, 1991; Rosas et al., 1995, 1998, 2001). Una respuesta inflamatoria asociada con los altos niveles de aeropartículas podría ser una de las posibles causas de los altos índices de enfermedad respiratoria y cardiovascular. Lo anterior resalta la importancia de conocer tanto la concentración, así como el posible efecto de los componentes de las PM₁₀ que están influyendo sobre la salud. Dado que no es posible utilizar modelos *in vivo* el estudio de dichos productos sobre modelos celulares *in vitro* permite evaluar la participación de las partículas en la inducción de respuesta inflamatoria.

HIPÓTESIS.

- Las PM₁₀ de la Ciudad de México serán capaces de inducir un efecto citotóxico y pro-inflamatorio diferencial dependiendo de la zona de colecta.
- Existirá un incremento diferencial en los niveles de transcripción del RNAm de TNF α e IL-6, así como en la producción de estas citocinas pro-inflamatorias en monocitos expuestos a partículas provenientes de diferentes áreas de la Ciudad de México.

- Los sobrenadantes producidos por monocitos estimulados con partículas serán biológicamente activos.
- La concentración de endotoxinas asociadas a las PM₁₀ de la Ciudad de México será diferente dependiendo de la zona de colecta.

OBJETIVOS.

1. Evaluar el potencial citotóxico de las aeropartículas, así como de su fracción soluble e insoluble, en una línea de monocitos de ratón (J774A.1) en dos estados celulares: proliferación y confluencia.
2. Evaluar los cambios en los niveles de transcripción de RNAm para TNF α e IL-6 de células expuestas *in vitro* a diferentes concentraciones de aeropartículas obtenidas en tres zonas de la Ciudad de México.
3. Medir los niveles de proteínas producidas (TNF α e IL-6) por células expuestas *in vitro* a aeropartículas obtenidas en diferentes áreas de la Ciudad de México.
4. Evaluar la actividad biológica de los sobrenadantes producidos por células expuestas a partículas en una línea de fibroblastos de ratón (L929) sensible a TNF α .
5. Cuantificar la concentración de endotoxina asociada a las aeropartículas obtenidas en diferentes zonas de la Ciudad de México.

AREA DE ESTUDIO.

Debido a la heterogeneidad en distribución, composición y concentración de partículas, se seleccionaron 3 zonas de la Ciudad de México que presentan características de urbanización diferentes para realizar la colecta de aeropartículas (Fig 1).

Zona norte.

Las muestras de aeropartículas de la zona norte se obtuvieron en la delegación Gustavo A. Madero, que se caracteriza por tener un terreno urbano heterogéneo fragmentado por barreras naturales o artificiales que alteran su continuidad. La topografía de la delegación presenta, áreas planas aptas para el desarrollo de actividades urbanas, y elevaciones que sin ser adecuadas para usos urbanos han sido ocupadas por asentamientos humanos. El uso mixto es característico en las colonias de nivel medio y bajo donde se mezcla vivienda con comercios, servicios básicos, establecimientos industriales y bodegas. Presenta una circulación de vehículos intensa, lo que origina frecuentes congestionamientos que dificultan la comunicación. Un crecimiento acelerado en la generación de residuos sólidos hace insuficiente el servicio, generando acumulación de desechos en lugares inapropiados. En este sector se concentra buena parte de la actividad industrial de la cuenca de México, abarcando un 3.5% de la superficie total. Tiene poca disponibilidad de agua y baja calidad de suelos y aire. Las áreas verdes y espacios abiertos ocupan 7.1% del suelo, generando un índice de 1.7 m²/hab (García, 2000).

Zona Centro.

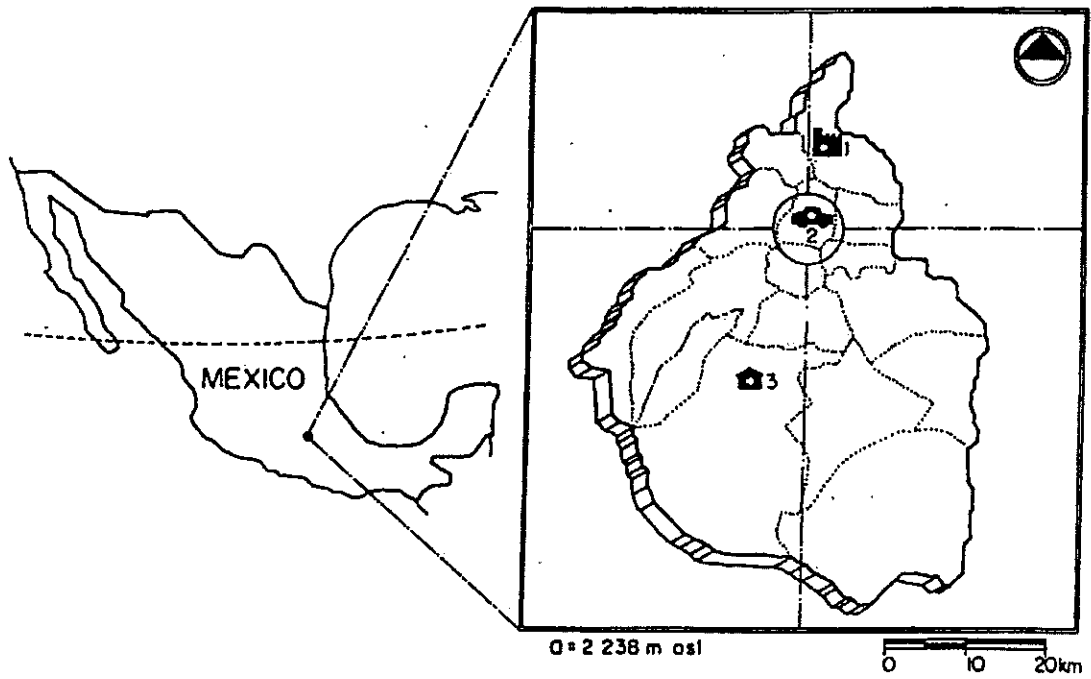
Las muestras de aeropartículas de la zona centro se obtuvieron en la delegación Cuauhtémoc, donde predomina el uso de suelo mixto. Registra un alto grado de consolidación urbana. Todas las viviendas cuentan con servicios habitacionales básicos; agua, drenaje y energía eléctrica. Las colonias habitadas por la clase media, presentan las mejores condiciones habitacionales, acceso a servicios y equipamientos, y son las mejor dotadas de espacios verdes. Sin embargo, en los sectores de menores recursos la principal opción habitacional son las vecindades que muestran gran deterioro. Destacan los mercados tradicionales donde se despliega una intensa actividad comercial. La delegación presenta como carencia fundamental la presencia de espacios verdes, cuya gravedad se puede inferir del hecho de que existen tan sólo 2.1 m²/hab, cuando la norma urbana establece un mínimo de 4.5 m²/hab. La red vial es insuficiente, presentando problemas de circulación y congestionamiento en el centro. Uno de los principales problemas de la delegación es la presencia generalizada del comercio en la vía pública. Esta actividad genera suciedad, entorpece la circulación de personas y autos, y crea contaminación (Ziccardi, 2000).

Zona Sur.

Las muestras de aeropartículas de la zona sur se obtuvieron en la delegación Coyoacán, en donde la mayor parte del territorio y principal función corresponde al uso habitacional. Le sigue en importancia el uso mixto. Coyoacán es una de las delegaciones mejor dotadas de equipamiento urbano, cuenta con agua potable,

dos plantas de tratamiento de aguas residuales, alcantarillado y alumbrado público. Es sede de la UNAM, UAM-Xochimilco y el tecnológico de Culhuacán. Cuenta con servicios de salud, casas de la cultura, bibliotecas, auditorios, teatros, museos y galerías, plazas, parques, jardines y explanadas. Lo anterior indica un claro predominio de vivienda de buena calidad, pero no niega la presencia considerable de viviendas precarias o deterioradas. Sin embargo, a pesar de ser una de las delegaciones más arboladas, el déficit de parques urbanos es inferior al que la Organización Mundial de la Salud propone como mínima. En Coyoacán también existe contaminación a varios niveles. Las aguas freáticas son contaminadas por la carencia de drenaje en asentamientos irregulares (zona de los pedregales), la delegación es afectada por las tolveneras provenientes del antiguo lago de Texcoco. El suelo también está contaminado por aguas residuales acumuladas en zonas sin drenaje. Además de los gases provenientes de los vehículos automotores que deterioran la calidad del aire (Ramírez y Benigno, 2000).

Ciudad de México



Sitios de muestreo:

1. Norte: área urbano-industrial
2. Centro: área urbano-comercial
3. Sur: área residencial.

Fig 1. Localización de los sitios de muestreo

METODOS.

I TRABAJO DE CAMPO.

Muestreo de material particulado menor de 10 μm (PM_{10}).

La colecta de aeropartículas se realizó con un muestreador para PM_{10} de grandes volúmenes (Fig 2A) Andersen/GMW (modelo 1200 VFC), el cuál se fundamenta en el fraccionamiento de las partículas por su distribución en tamaños (Fig 2B). El muestreador colecta partículas con un diámetro aerodinámico menor o igual a 10 micrómetros, a un flujo de 1.13 m^3/min que se mantiene con un controlador de flujo (Andersen Sampler Inc., 1984). Se utilizaron como medio de colecta filtros de fibra de vidrio tipo A/E de 20.3 x 25.4 cm, marca Gelman. Los filtros fueron previamente estabilizados por 24 horas en un cuarto de temperatura ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 5\%$) constantes. Posteriormente fueron pesados antes y después del muestreo en una balanza analítica (Sartorius, modelo A200-S) con sensibilidad de 0.1 mg. La colecta de las muestras se realizó por 24 horas, de lunes a viernes durante un período de un año.

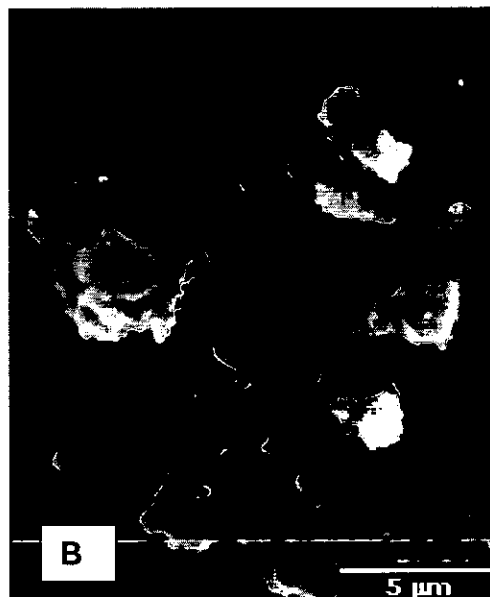
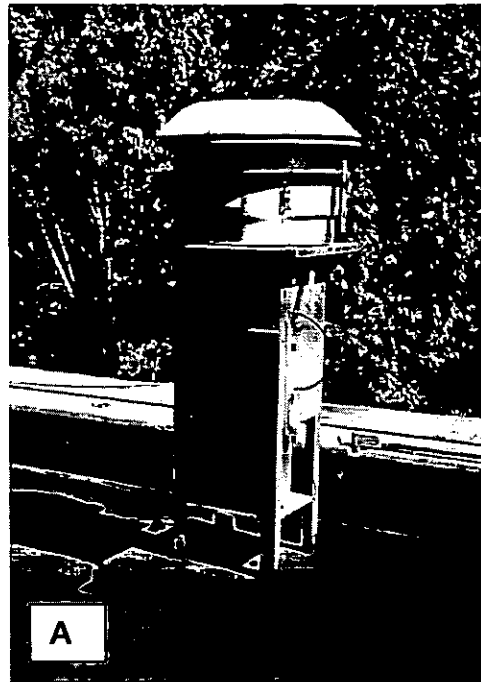


Fig 2. **A)** Muestreador de grandes volúmenes Andersen/GMW modelo 1200 VFC para PM₁₀. **B)** ultramicrografía con microscopio electrónico de barrido de un filtro de fibra de vidrio, se observa la impactación y heterogeneidad del PM₁₀.

II TRABAJO DE LABORATORIO.

Obtención de PM₁₀.

Se hizo la selección aleatoria de 3 filtros por semana de muestreo, las aeropartículas fueron recuperadas sonicando los filtros en seco (sonicador Branson modelo 5210, Branson Ultrasonics Corporation, USA) durante dos horas y posteriormente se realizó un barrido cuidadoso con un pincel de pelo fino, para evitar el desprendimiento de fibras del filtro. Una vez obtenidas las partículas, se mezclaron y guardaron en desecador a 4°C hasta su uso.

Obtención de las fracciones soluble e insoluble.

Se pesaron 2.3 mg de partículas de cada zona y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Se resuspendieron en 3 mL de medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) y se separaron en dos viales de polipropileno. Los tubos con 1.5 mL de la suspensión se sonicaron durante 15 min. (Branson Ultrasonics Corporation, USA). Uno de los tubos se centrifugó a 14000 g en microfuga (Beckman GS-15R, Instruments Inc, Germany). por 15 min. El sobrenadante fue colectado y considerado como fracción soluble. El botón se resuspendió en 1.5 mL de medio fresco y se consideró como la fracción insoluble. En el otro vial se conservó la suspensión que se consideró como fracción total.

Para controlar la participación de efectos inespecíficos filtros limpios (blancos) se trataron de la misma manera antes referida para obtener fibras de vidrio sin partículas.

1. Citotoxicidad de las partículas.

Para establecer las condiciones de activación celular y cuantificar la producción de citocinas, la toxicidad de las partículas se evaluó bajo dos estados celulares: células en proliferación y células en confluencia. Células tratadas con partículas y su respectivo control sin tratamiento se analizaron mediante un ensayo colorimétrico, que consiste en teñir con cristal-violeta las células vivas adheridas a la placa de cultivo celular (Kuenc et al., 1989). La cantidad de colorante retenido por las células se cuantificó con un lector de placas (Labsystem Multiscan, MCC/340) a 570 nm.

Para este estudio se utilizó la línea de monocitos murinos J774A.1 (American Type Culture Collection, Virginia USA). Las células fueron crecidas en DMEM bajo en glucosa, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos (fungisóna 750 ng/mL, penicilina 100 µg/mL y estreptomina 150 µg/mL). Los cultivos de monocitos fueron expuestos a diferentes concentraciones de partículas, así como a las fracciones soluble e insoluble. Los ensayos de proliferación se realizaron con un tiempo de exposición de 72 horas, de acuerdo a lo establecido por Bonner y colaboradores (1998) y Alfaro (1999). Células en confluencia fueron expuestas por 24 horas, tiempo en el que se realizaron los experimentos de cuantificación de citocinas.

1.1 Células en proliferación.

Las células fueron sembradas a una densidad de 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, dejándolas adherir por 24 horas. Al término de este tiempo

fueron expuestas, en presencia de suero, a las PM_{10} , así como a las fracciones soluble e insoluble de las mismas. Procedentes de las tres zonas de muestreo. Se emplearon concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ con un tiempo de exposición de 72 horas. El medio de cultivo se eliminó y se realizó un lavado con amortiguador de fosfatos (PBS). Se agregó formol neutro al 10% durante 24 horas, se retiró y se lavó con PBS. Se adicionaron 100 μl de cristal violeta al 0.1%, dejándolo en agitación por 10 min. Nuevamente se lavó con PBS y se adicionaron 100 μl de ácido acético al 33%. Finalmente la placa fue leída en un lector de placas (Labsystem Multiscan, MCC/340) a 570 nm y comparada contra un control de células no expuestas.

1.2 Células en confluencia.

Para este ensayo sesenta mil células fueron sembradas por pozo, dejándolas adherir por 24 horas. Al término de este tiempo, el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM suplementado con insulina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, transferrina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y selenio de sodio 10 ng/mL (ITS), en ausencia de suero durante 24 horas. Después, las células fueron expuestas a las partículas durante 24 horas con las mismas concentraciones que en los experimentos en proliferación; después se continuó con la técnica de cristal violeta mencionada anteriormente.

1.3 Citotoxicidad de fibras de vidrio provenientes del filtro de colecta.

Para evaluar el efecto tóxico de las fibras de vidrio se realizó el mismo ensayo descrito para las células en proliferación, 72 horas de exposición y la técnica de cristal violeta previamente descrita.

1.4 Citotoxicidad del estándar de LPS.

Se realizó una curva de citotoxicidad del estándar de LPS de *E. Coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich Chemie Gmbb, Germany) utilizando el método de cristal violeta. Las condiciones utilizadas fueron células confluentes y 24 horas de exposición a concentraciones de 0 a 100 µg/mL. El propósito fue seleccionar la concentración adecuada que estimulara la liberación de citocinas (control positivo).

2 Evaluación de los niveles de transcripción del RNAm para IL-6 y TNF α

Para evaluar cambios en la transcripción de la síntesis de RNAm para IL-6 y TNF α se utilizó la técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) descrita por Chelly y Kahn (1994), la cual nos permite realizar una evaluación semi-cuantitativa.

Células confluentes y en ausencia de suero fueron expuestas a 5, 10 y 20 µg/cm² de PM₁₀ por 4 horas. Como control positivo se utilizó estándar de LPS de *E. coli* 055:B5 para estimular a las células e inducir activación y liberación de citocinas. Al término de la exposición se procedió a la extracción del RNA total.

2.1 Extracción de RNA total de células en cultivo

Para la extracción del RNA se utilizó el reactivo Trizol (Gibco-BRL 5596 ^{UA}/_{UB}), este método es una adaptación del método original de un sólo paso de Chomczynski y Sacchi (1987), y Chomczynski (1993) con el que se aseguró la obtención de RNA de buena calidad y se evitó la introducción de RNAsas. Dicho proceso consistió en los siguientes pasos:

1.- Homogenización: El medio de cultivo de células, previamente expuestas a partículas, fue eliminado por vacío y las células fueron lisadas directamente en la caja de cultivo agregando 1 mL de trizol por pozo de 3.5 cm de diámetro. El lisado fue reunido con un raspador de goma nuevo y recuperado con micropipeta, resuspendiendo en repetidas ocasiones. Finalmente fue depositado en un tubo para microcentrífuga e incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2.- Separación de fases: En cada tubo se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de trizol y se agitó fuertemente (sin vortex), dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugó a 12000 g a 4°C por 15 minutos y se recuperó únicamente la fase acuosa. Se procedió a realizar una segunda extracción adicionando 500 μ l de trizol, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

3.- Precipitación del RNA: El RNA se precipitó mezclándolo volumen (1:1) con isopropanol a 4°C y se dejó reposar durante 24 horas. Al término se centrifugó a 12000 g por 15 min.

4.- Lavado del RNA: El sobrenadante fue eliminado y el RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75% a 4°C, se mezcló perfectamente con vortex y se centrifugó a 7500 g por 5 min.

5.- Solubilización y cuantificación del RNA: La pastilla fue secada parcialmente con vacío dejándola reposar por 15 min y finalmente disuelta en 25 μ L de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma Chemical Co). La concentración de RNA total obtenida fue evaluada por espectrofotometría a 260-280 nm (Beckman

Modelo DU650, USA), de acuerdo a Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989), para lo cual se realizó una dilución 1:200 con agua DEPC y se leyó a una densidad óptica de 260 nm, utilizando como blanco agua DEPC. Finalmente se realizaron los cálculos de cuantificación, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{RNA}_{\text{TOTAL}} = (A_{260}) (40 \mu\text{g}/\mu\text{L}) (\text{factor de dilución})$$

Para corroborar la integridad del RNA extraído una muestra de 1 µg de RNA total se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, en amortiguador TBE (tris-HCl 0.89M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 25 mM) teñido con bromuro de etidio, el cual fue fotografiado con una cámara polaroid MP-4.

2.2 Síntesis de cDNA (DNA complementario).

Para la síntesis del cDNA se utilizó el kit Super Script™ Preamplification System for First strand cDNA Synthesis (Gibco-BRL) siguiendo las indicaciones del manual de instrucciones. Este consiste en un sistema de preamplificación con transcriptasa reversa (Super Script) para síntesis de cDNA de una cadena, utilizando hexámeros al azar.

Se tomó una muestra de 30 ng de RNA total para TNF α (control y experimental), y 1 µg de RNA total para IL-6, a los que se adicionaron 50 ng de hexámeros al azar para llevar a un volumen final de 12 µL. Se incubó a 70°C durante 10 min para la desnaturalización del RNA e inmediatamente se dejó 1 min en hielo. Al término se le agregaron 7 µL de una mezcla de reacción que contenía buffer PCR 1X (200 mM de Tris-HCl pH8 y 500 mM KCl), MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.5 mM c/u y DTT 0.01M, por cada reacción, se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó a

25°C por 5 min. Después se adicionaron 100 U de SuperScript II RT, se mezcló e incubó a 25°C por 10 min. Posteriormente se incubó a 42°C por 50 min y a 70°C por 15 min. Al finalizar la incubación se centrifugó y se colocó en hielo. Se adicionó 1 U de RNasa H y se incubó a 37°C por 30 min. Al término el cDNA resultante fue guardado a -20°C ó inmediatamente llevado a PCR.

2.3 Amplificación por PCR.

Se tomaron 5 y 2 μ L de cDNA (IL-6 y TNF α respectivamente) y se llevaron a un volumen de 10 μ L con agua DEPC. Se adicionaron 10 μ l de mezcla de reacción para PCR que contenía buffer PCR 1X, MgCl₂ 1 mM, dNTP's 0.2 mM c/u , iniciadores 5' y 3' 50 pmol, 1.25 U de Taq DNA polimerasa y 4.7 μ L de agua por reacción. Se le adicionaron 25 μ L de aceite mineral para PCR y se colocaron en el termociclador Perkin Elmer 480 (Applied Biosystem San José Ca, USA). Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron:

IL-6 5' TTC CTC TCT GCA AGA GAC T

IL-6 3' TGT ATC TCT CTG AAG GAC T

TNF α 5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC

TNF α 3' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC

β -actina 5' ATG GAT GAC GAT ATC GCT

β -actina 3' ATG AGG TAG TCT GTC AGG T

Secuencias tomadas del Current protocols in immunology, suppl 14, Tabla 10.23.2. (Coligan et al., 1992). Las condiciones de amplificación para IL-6 y β -actina fueron 95°C por 5 min para la desnaturalización del cDNA, y posteriormente se inició una coamplificación con desnaturalización a 95°C por 50 seg, alineación de iniciadores a 54°C por 50 seg y extensión a 72°C por 1 min, durante 35 ciclos. Para $\text{TNF}\alpha$, la desnaturalización se realizó a 95°C por 50 seg, alineación de iniciadores a 62°C por 50 seg y extensión a 72°C por 1 min, durante 35 ciclos.

2.4 Análisis del producto amplificado de cDNA.

Una alícuota de 3 μl del producto amplificado de cDNA para $\text{TNF}\alpha$ y 5 μl para IL-6 fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE. El gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado. Las imágenes fueron capturadas (Scan Jet 4C, Hewlett Packard) y analizadas utilizando el programa NIH Image (NIH, Image National Institute of Health, USA.). Para obtener las densidades correspondientes, se eligió un rectángulo que abarcara toda el área de la banda de mayor expresión y se evaluó la misma área en cada una de las bandas. Posteriormente las bandas fueron ajustadas con la densidad obtenida de un gen constitutivo (β -actina), el cuál a su vez se ajustó dividiendo el valor más alto de densidad de actina entre las demás lecturas, para obtener un factor de corrección que se multiplica por la densidad de las muestras. En ambos casos se restó la densidad de la expresión basal y los datos se reportaron como porcentajes respecto a un control, correspondiente a la densidad obtenida con

células sin estimular, al que se le asignó un valor del 1% de expresión para TNF α y 0% de expresión para IL-6.

3. Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6) en sobrenadantes de células monocíticas (J774A.1) expuestas a PM₁₀.

3.1 Obtención de sobrenadantes.

Para la obtención de sobrenadantes se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos, las cuales fueron sembradas a alta densidad y llevadas a confluencia dejando adherir las células por 24 horas. Al término de este tiempo, fueron cambiadas a medio DMEM-ITS en ausencia de suero por 24 horas. Posteriormente fueron expuestas a partículas totales en concentraciones de 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, así como a las fracciones soluble e insoluble. El tiempo de exposición fue de 24 horas, al término de la misma, los sobrenadantes de las células expuestas se colectaron y centrifugaron a 14000 g durante 15 min para eliminar partículas o restos celulares que pudieran interferir en la cuantificación. Los sobrenadantes fueron congelados a -70°C hasta que se analizaron.

3.2 Cuantificación de citocinas.

La cuantificación de citocinas se realizó por ELISA utilizando el kit Quantikine M murine (R & D Systems, Minneapolis, USA) específico para ratón, siguiendo las indicaciones del instructivo. Se adicionaron 50 μl por pozo de sobrenadante y/o estándares en placas previamente cubiertas con anti-TNF α y anti-IL-6, respectivamente. Se incubó a 25°C durante 2 horas. Al término la placa fue

lavada y posteriormente se le adicionaron 100 μ l de la solución de anticuerpo conjugado a cada pozo. Nuevamente se cubrió la placa y se incubó por 2 horas. Se lavó y se adicionaron 100 μ l de solución sustrato, colocando la placa sin cubrir en la obscuridad por 30 min. Finalmente se adicionaron 100 μ l de la solución para detener la reacción y la placa fue leída en un lector de placas a 450 nm (Labsystems Multiskan MS Modelo 352, Finlandia), con una lectura de referencia de 570 nm. Posteriormente se calculó la concentración de citocinas en los sobrenadantes utilizando el software Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp., USA).

4. Actividad celular citotóxica inducida por sobrenadantes de monocitos expuestos a PM₁₀ en células L929.

Para analizar la actividad biológica de los sobrenadantes de las células expuestas a partículas, se utilizó un ensayo de viabilidad en la línea celular L929 (ATCC), la cual es sensible a TNF α . Empleando el kit Cell Proliferation Kit II XTT (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, IN. USA), que consiste en la cuantificación de células viables capaces de metabolizar una sal de tetrazolium (XTT), a una sal de formazan soluble por actividad de deshidrogenasa mitocondrial (Scudiero et al., 1988).

Las células fueron sembradas a subconfluencia (densidad celular de 30,000 céls/pozo) en placas de cultivo de 96 pozos. Se utilizó medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de SFB. Se dejaron adherir las células durante 24 horas. Posteriormente se adicionaron 50 μ l de medio de ensayo, que contenía medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1.2 μ g/mL de actinomicina D.

Finalmente se adicionaron 50 μ l de TNF α estándar o 50 μ l de sobrenadantes obtenidos de células expuestas a 20, 40 y 80 μ g/cm² de PM₁₀. Se incubó durante 18 horas a 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂—aire. Después se adicionaron 50 μ l del reactivo XTT y nuevamente se incubó por 4 horas. Concluido el tiempo de incubación la placa fue leída en un lector de placas (Labsystems Multiskan MS) a 450 nm, utilizando como lectura de referencia 690 nm. Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando el software de estadística, Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp, USA).

5. Cuantificación de endotoxinas asociadas a PM₁₀.

La concentración de endotoxinas asociadas a las partículas fue determinada por el método cinético cromogénico de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), utilizando un kit que contiene endotoxina estandar (*E. Coli* O55:B5) y un liofilizado del LAL con un sustrato cromogénico (Bio Whittaker, Walkersville, Md) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para la extracción de endotoxinas, así como en las diluciones, se utilizó amortiguador estándar de fosfato de potasio 0.05 M y 0.01% de trietilamina (pH 7.5) libre de endotoxinas (Milton, 1992). Toda la cristalería fue horneada a 270°C durante 2 horas antes de ser utilizada. La endotoxina fue extraída a partir de 50 mg de partículas en 5 mL de amortiguador estándar con un sonicador (Branson modelo 5210), durante 60 min a 20°C. Alícuotas por duplicado de 100 μ l y diluciones seriadas 1:10 de estándar de endotoxina y 1:8 de las muestras de partículas fueron colocadas en pozos de microplacas para ELISA para ser

RESULTADOS

1. Citotoxicidad de las partículas.

Los experimentos de citotoxicidad fueron realizados por triplicado y se reportan como promedios con desviación estándar. Para la condición de células en proliferación, las PM_{10} de la Ciudad de México generaron una reacción citotóxica dependiente tanto de la concentración como de la zona de colecta, siendo las partículas del norte más tóxicas ($p < 0.0001$), que las colectadas en el centro y sur. Dichas partículas produjeron una disminución en la viabilidad de $83.2 \pm 3.6\%$, a una concentración de $320 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que para la zona centro y sur la disminución de la viabilidad fue de $54.4 \pm 5.4\%$ y $68.2 \pm 2.3\%$, respectivamente (Fig. 3A).

La participación de la fracción insoluble en la toxicidad de las partículas fue mayor que la soluble, la mortalidad producida fue de $84.8 \pm 1.3\%$, con una exposición de $320 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la zona norte, mientras que a la misma concentración, la mortalidad para el centro y sur fue de 63.0 ± 4 y $67.2 \pm 2\%$, respectivamente (Fig. 3B).

Con respecto a la actividad tóxica de la fracción soluble (sobrenadante obtenido del lavado de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas) se encontró que está se presentaba entre 160 y $320 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (240 y $480 \mu\text{g}/\text{mL}$) para las tres zonas, nuevamente se observó que las partículas de la zona norte eran más tóxicas induciendo una mortalidad del $54 \pm 5.4\%$ de las células. Con respecto a la zona sur y centro la mortalidad fue de $43 \pm 3.2\%$ y $32 \pm 3.3\%$ respectivamente (Fig. 3C). Un hecho importante se

observó cuando se utilizaron concentraciones menores de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, solo las partículas obtenidas del centro tuvieron un efecto tóxico disminuyendo la viabilidad en un $15 \pm 9.3\%$.

Para las células en confluencia, se observó que las partículas no tienen un efecto tóxico. En relación a las fracciones insoluble y soluble tampoco se observó una actividad tóxica significativa (Fig. 3D-F).

Con este ensayo se confirmó que las condiciones de tiempo de exposición de 24 horas, ausencia de suero y confluencia, no afectan la viabilidad celular. Lo que permite su utilización para la cuantificación de citocinas en sobrenadante.

Los ensayos de citotoxicidad de fibras de vidrio mostraron que éstas son tóxicas a concentraciones \geq a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 4), niveles que no se presentaron en ninguno de los ensayos realizados, corroborado con una comparación al microscopio óptico entre una concentración de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibras contra $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas se pudo corroborar que las muestras poseían pocas fibras (Fig. 5).

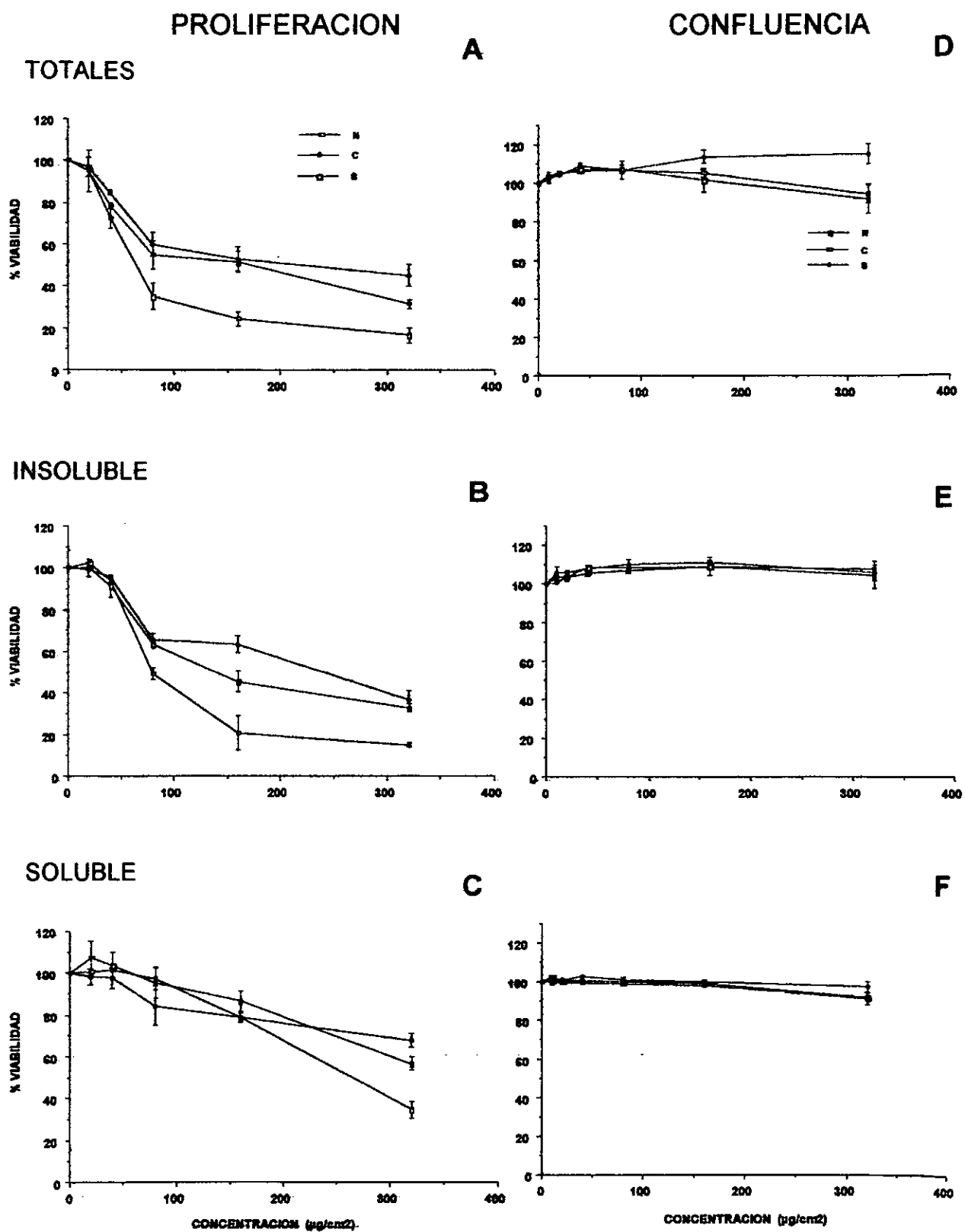


Fig 3. Citotoxicidad en monocitos J774A.1 expuestos a PM_{10} totales, fracción soluble e insoluble, células en proliferación (A, B y C) y en confluencia (D, E y F)

J774 EXPUESTAS POR 72 H A FIBRAS DE VIDRIO

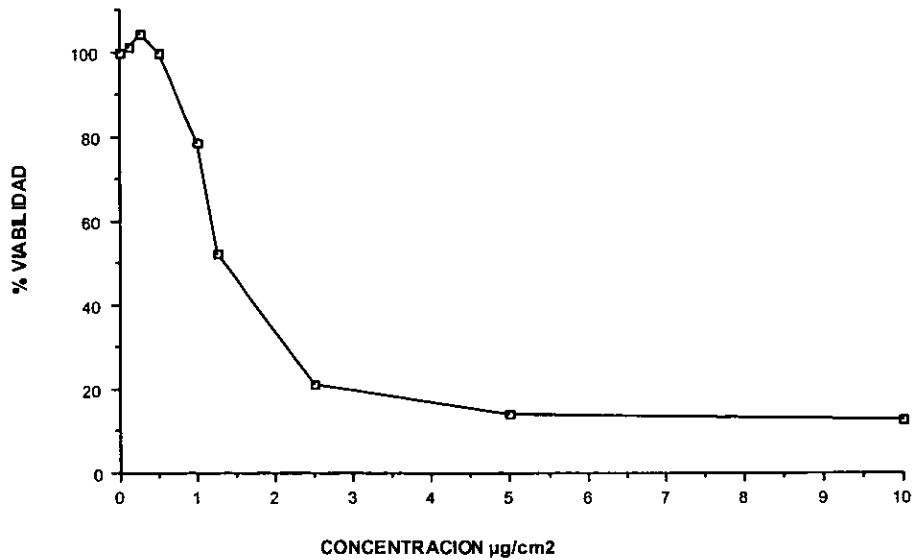


Fig 4. Citotoxicidad de fibras de vidrio provenientes de los filtros de colecta en células J774A.1 en proliferación, expuestas por 72 horas.

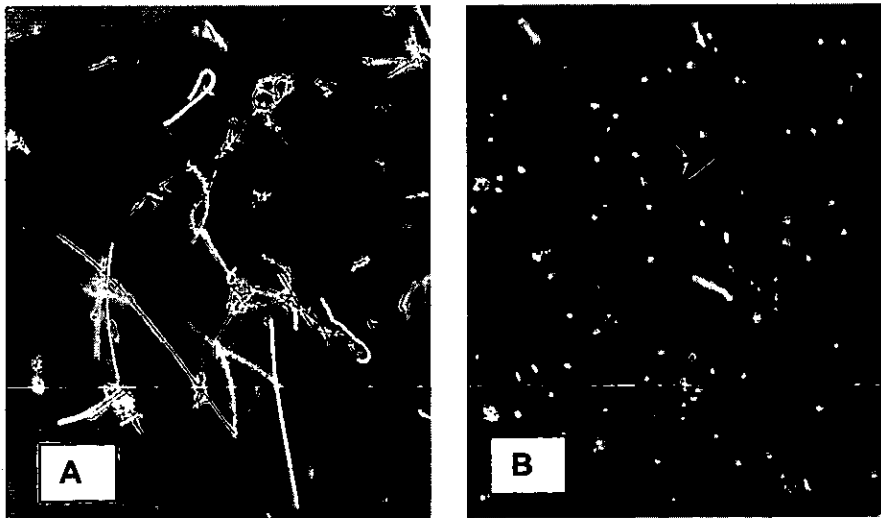


Fig 5. **A)** Densidad de fibras de vidrio ($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con **B)** densidad de fibras presentes en PM_{10} de la zona norte ($20\mu\text{g}/\text{cm}^2$) X 100. Las flechas indican la presencia de fibras de vidrio en muestras de aeropartículas.

El ensayo de toxicidad realizado con el estándar de LPS de *E. coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich), muestra que este no disminuye la viabilidad celular, aun utilizando concentraciones de 100 µg/mL de LPS, lo que permitió su utilización como control positivo en los ensayos de cuantificación de RNAm y producción de las proteínas (TNF α e IL-6). La concentración seleccionada para la estimulación celular fue de 10 µg/mL (Fig. 6).

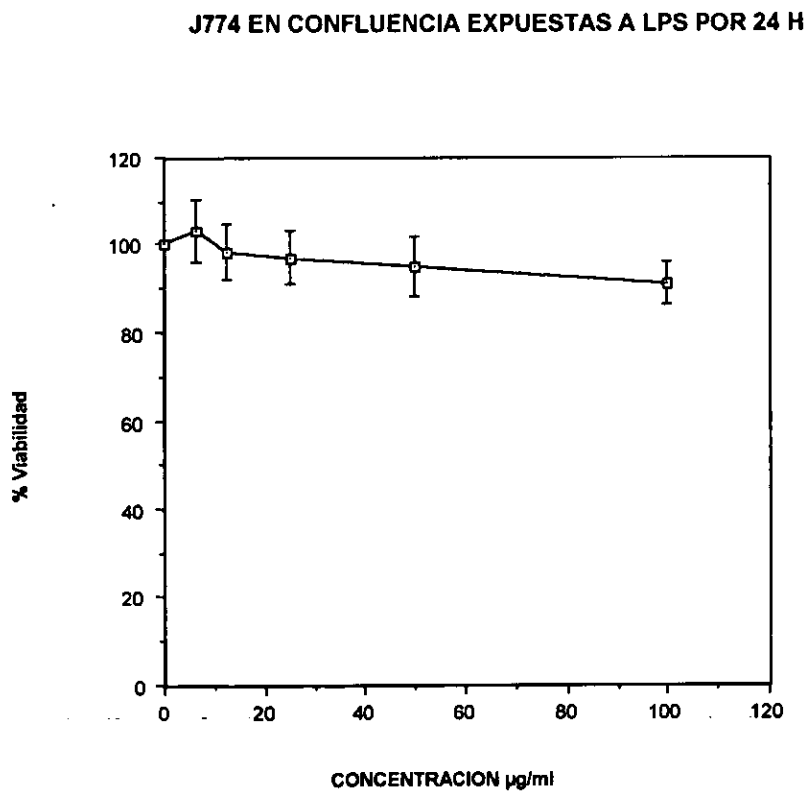


Fig 6. Citotoxicidad de células J774A.1 expuestas a estándar de LPS en confluencia a 24 horas de exposición.

2. Evaluación de los niveles de transcripción del RNAm para $TNF\alpha$ e IL-6 en monocitos expuestos a PM_{10} .

Debido al antecedente de la capacidad de las partículas para inducir cortes en el material genético (Alfaro, 1999), se procedió a verificar la integridad del RNA total extraído, utilizado en el RT-PCR. En la figura 7 se pueden observar las bandas del RNA ribosomal (fracción 18S y 28S), así como la homogeneidad de la cuantificación.

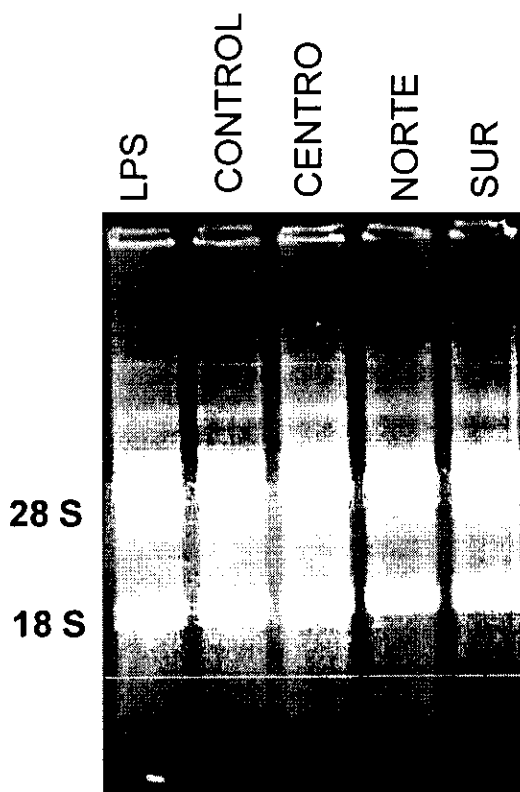


Fig 7. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra la integridad del RNA total extraído de células J774 A.1 expuestas a partículas del centro, norte y sur ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) durante 4 horas.

En la figura 8 se puede observar que las células estimuladas con $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas de las diferentes zonas inducen la expresión de $\text{TNF}\alpha$ (promedio de cuatro experimentos). Se observan niveles similares de transcrito en todas las zonas, siendo ligeramente mayor con las partículas de la zona sur. Otro hecho importante es que la cantidad de RNAm amplificado de células tratadas con partículas, muestra valores densitométricos cercanos a los producidos por células estimuladas con LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). También hay que considerar que la concentración de RNA total utilizada en el RT-PCR fue muy pequeña (30 ng), lo que indica que la producción de esta citocina es abundante.

En el caso de IL-6 las partículas también indujeron la expresión del RNAm (promedio de tres experimentos). Se observó una producción menor con respecto a $\text{TNF}\alpha$, ya que se inició con una concentración de $1 \mu\text{g}$ de RNA total. Sin embargo, es más evidente una tendencia hacia una producción mayor de esta citocina en células expuestas a $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas del sur, mientras que las partículas del norte y centro mostraron niveles similares (Fig. 9).

En ambos casos, para la cuantificación del transcrito se utilizó un gen constitutivo (β -actina), que permitió corregir las diferencias en concentración en cada una de las muestras. Ambas figuras (8 y 9) muestran que las bandas de expresión de β -actina, es muy similar en todos los carriles, y por consiguiente también lo es la concentración haciendo evidente la diferencia en expresión en ambos genes después de la estimulación con partículas con respecto a las células control.

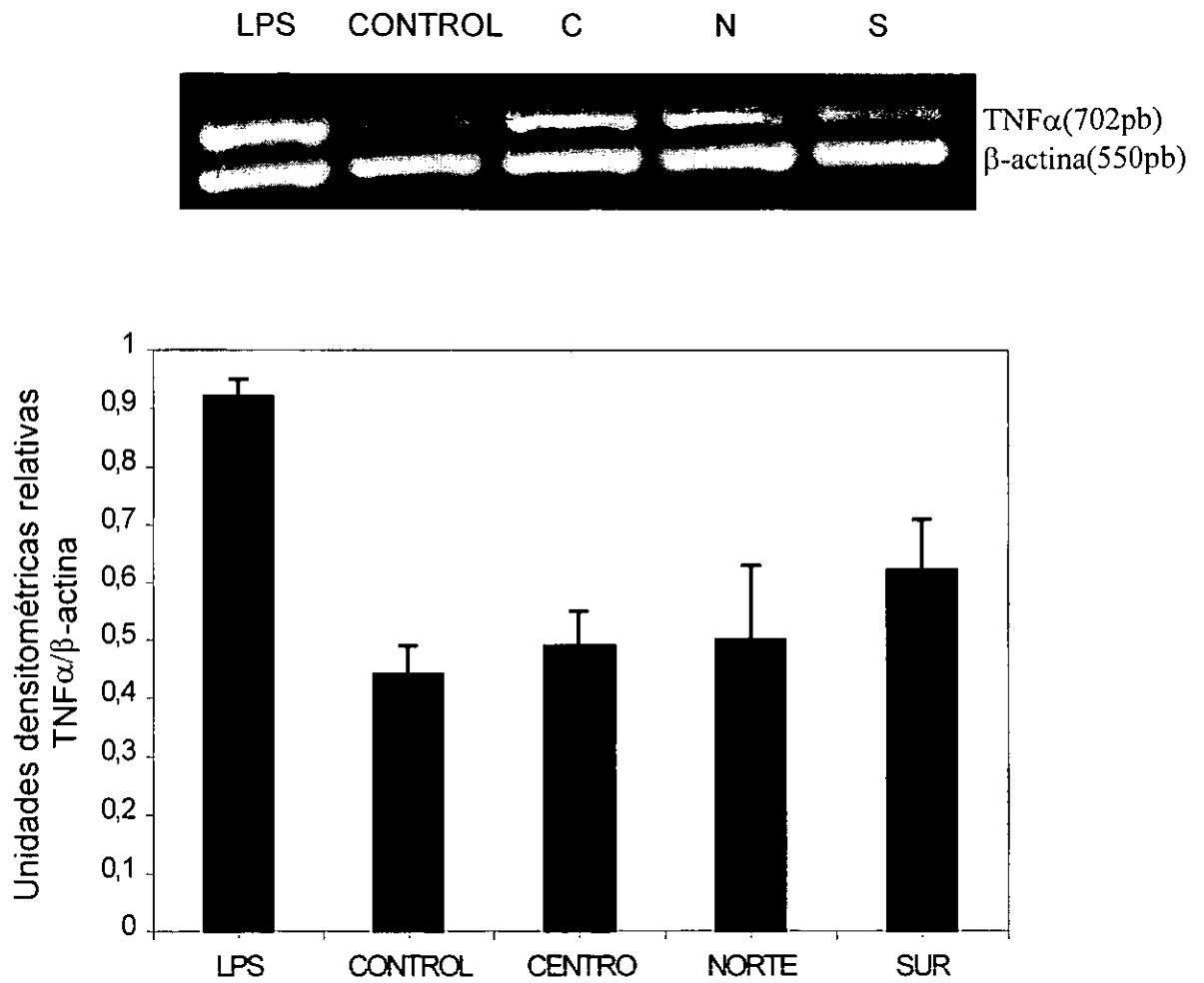


Fig 8. Expresión de TNF α en células J774A.1 expuestas a 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM $_{10}$ de la Ciudad de México utilizando la técnica de RT-PCR (promedio de cuatro experimentos).

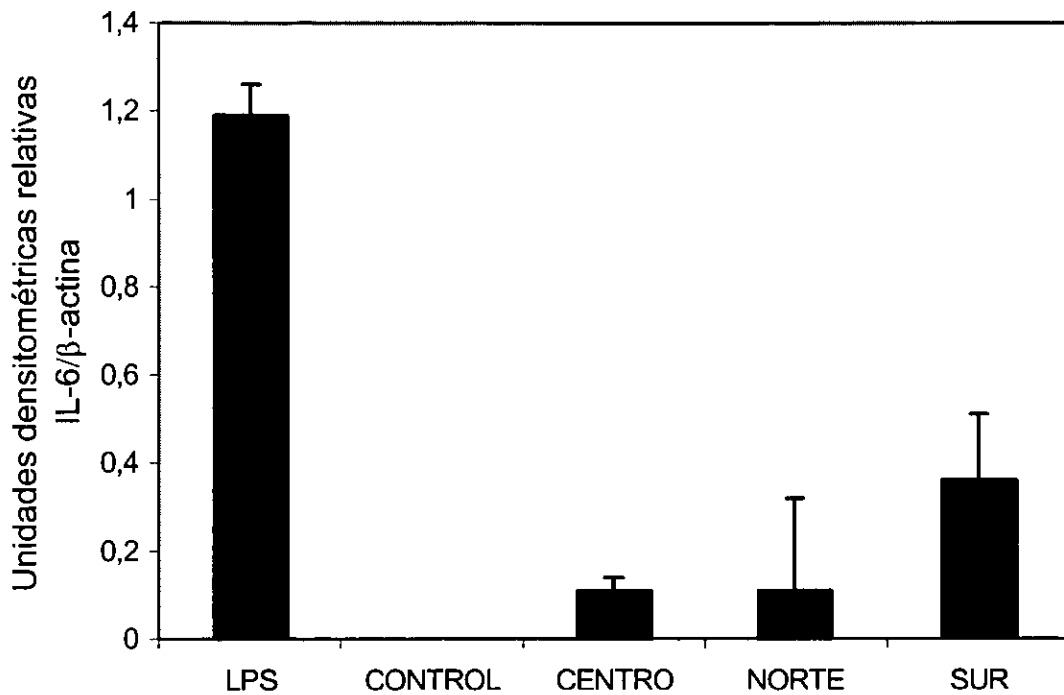
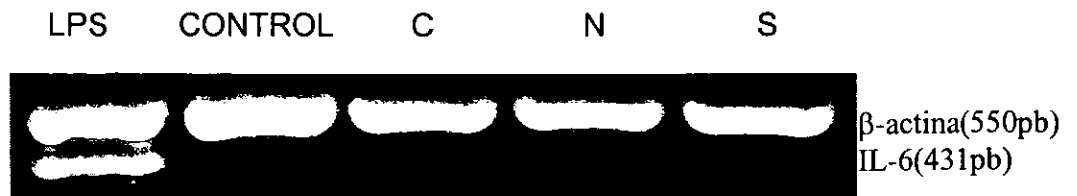


Fig 9. Expresión de IL-6 en células J774A.1 expuestas a $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la Ciudad de México utilizando la técnica de RT-PCR (promedio de tres experimentos).

3. Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadantes.

En la cuantificación de $\text{TNF}\alpha$ en sobrenadantes de células J774A.1 expuestas a partículas PM_{10} de las diferentes zonas de la Ciudad de México, se observó que las partículas son capaces de inducir la activación de macrófagos y liberación de citocinas dependiendo de la concentración ($p < 0.0001$). La concentración de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mostró mayor producción y liberación de $\text{TNF}\alpha$, seguida por las concentraciones de 40 y $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. Esta liberación aunque no significativamente fue dependiente del origen de las partículas, siendo las procedentes del centro inductoras más potentes ($6295 \pm 1162 \text{ pg}/\text{mL}$) que las del norte y sur (4684 ± 1239 y $4542 \pm 1103 \text{ pg}/\text{mL}$). Las células estimuladas con LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) produjeron $17800 \pm 2438 \text{ pg}/\text{mL}$ y células control produjeron $129 \pm 58 \text{ pg}/\text{mL}$ de $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 10).

De forma similar las partículas son capaces de inducir la producción de IL-6 dependiendo de la concentración. Se conserva la misma tendencia, observándose que las partículas del centro indujeron la producción más alta de IL-6 ($167 \pm 25 \text{ pg}/\text{mL}$), mientras que las partículas del norte y sur generaron una producción menor (113 ± 15.7 y $33 \pm 0.3 \text{ pg}/\text{mL}$), respectivamente. Los datos corresponden al promedio de seis experimentos, las células estimuladas con LPS produjeron $2356 \pm 79 \text{ pg}/\text{mL}$, mientras que células no expuestas a partículas no mostraron producción de IL-6 (Fig.11).

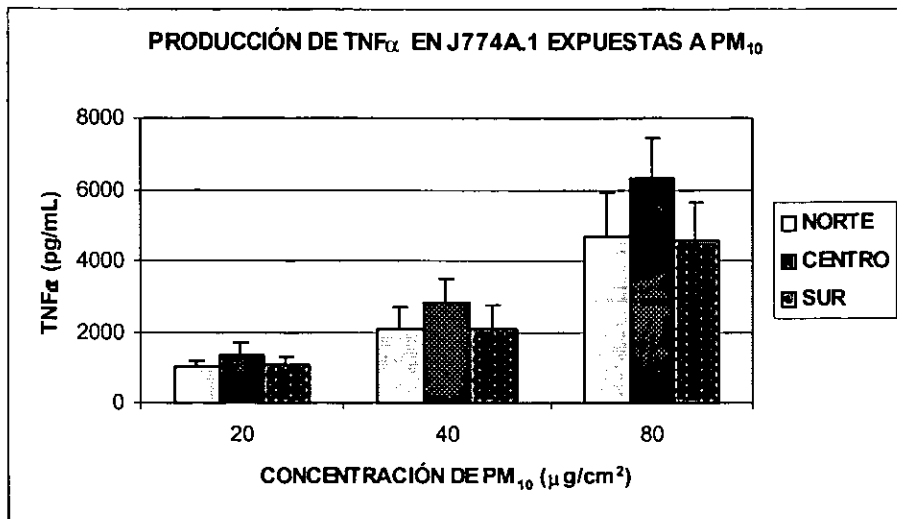


Fig 10. Cuantificación de TNF α en sobrenadantes de J774A.1 expuestas a 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀. Las células no expuestas a partículas produjeron 129 ± 58 pg/mL y las células estimuladas con $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS produjeron 17800 ± 2400 pg/mL de TNF α (promedio de cuatro experimentos).

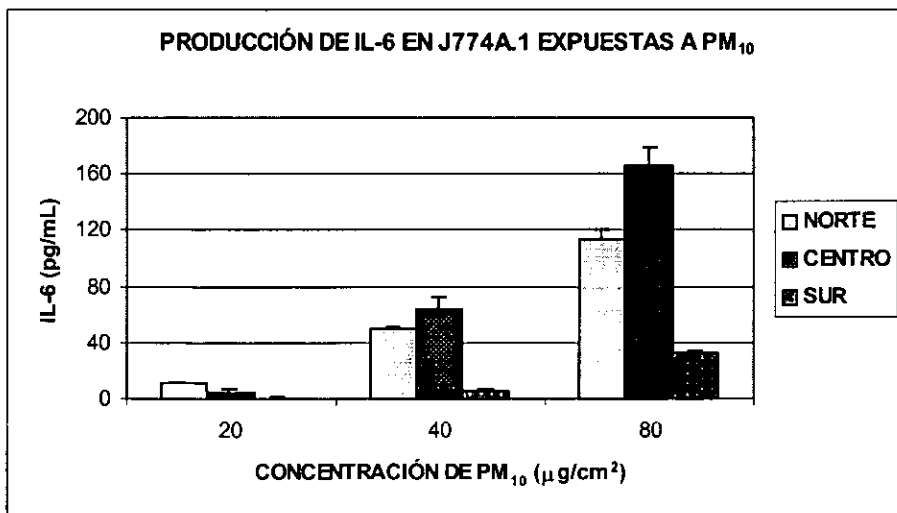


Fig 11. Cuantificación de IL-6 en sobrenadantes de J774 expuestas a 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀. Las células no expuestas a partículas no mostraron producción y las células estimuladas con $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS produjeron 2356 ± 79 pg/mL (promedio de seis experimentos).

4. Actividad celular citotóxica inducida por sobrenadantes de células estimuladas con PM₁₀ en células L929.

El ensayo de viabilidad de células L929 reveló que los sobrenadantes de células J774A.1 expuestas a partículas, son biológicamente activos, ya que cuentan con la capacidad de inducir mortalidad en una línea sensible a TNF α . En este ensayo se conservó el patrón ya mencionado de mayor toxicidad para los sobrenadantes provenientes de células expuestas a partículas de la zona centro, seguida por la zona norte y sur (Fig. 12).

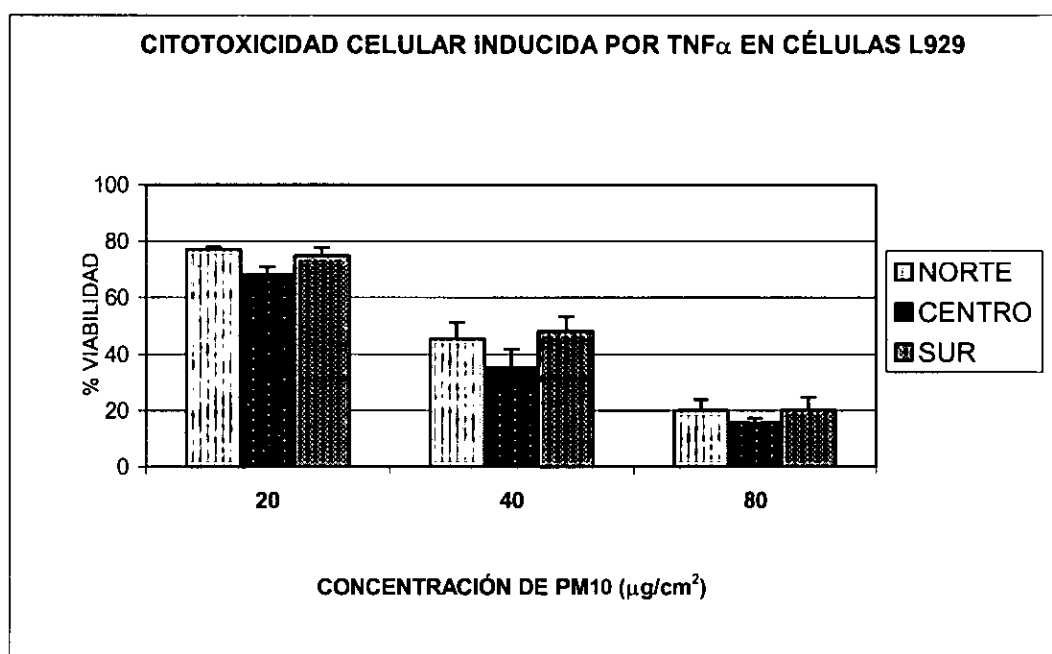


Fig. 13. Bioensayo de citotoxicidad celular inducida por sobrenadantes de células J774A.1 expuestas a PM₁₀ de diferentes zonas de la Ciudad de México, en células L929.

5. Cuantificación de endotoxinas presentes en aeropartículas.

Se realizaron tres determinaciones en cada zona, para conocer el contenido de endotoxinas presentes en muestras de PM₁₀ de la Ciudad de México. Los resultados revelaron diferencias en el contenido de endotoxinas dependiendo del origen de las partículas, la zona norte presentó los valores más altos, seguidos por la zona centro y por la zona sur respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Concentración de endotoxinas presentes en partículas colectadas en diferentes zonas de la Ciudad de México.

ZONA	MEDIANA *UE/mg	INTERVALO UE/mg
NORTE	98	52 -153
CENTRO	46	41 – 85.6
SUR	37	22 - 41

*UE Unidades de endotoxinas por mg de PM₁₀ determinadas por el método cinético cromogénico.

incubadas durante 10 min a 37°C. Después se adicionaron 100 µl de LAL y la reacción de *Limulus* fue monitoreada con un registrador de cinética de microplacas (QKC Bio Whittaker Walkersville, Md), el cuál posee un control de temperatura interno a 37°C. El registro de la reacción se realizó a 405 nm cada 150 segundos aproximadamente durante 90 minutos, con la ayuda de una computadora PC-XT. Todos los resultados fueron reportados considerando la curva estándar de endotoxina y expresados en UE/mg de PM₁₀.

6. Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se reportan como promedios con desviación estándar. La concentración letal al 50% (LC50) en los ensayos de citotoxicidad celular no pudo ser calculada linearizando los datos de la curva de viabilidad, por lo que únicamente se reportan como porcentaje de viabilidad. Para cada experimento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias significativas ($p < 0.01$).

La concentración de citocinas y el porcentaje de viabilidad en el ensayo de citotoxicidad de sobrenadantes fueron calculados utilizando el software Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp, USA).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Las actividades que se realizan en la Ciudad de México, inherentes a su crecimiento demográfico y urbano, han propiciado el incremento en el establecimiento de industrias, comercios y servicios, así como en el número de vehículos. Lo anterior ha ocasionado un deterioro en la calidad del aire de la ciudad. Una de las actuales preocupaciones, es poder identificar las fuentes de emisión de PM_{10} , el tipo y concentración de estas, así como el efecto que tienen sobre la salud.

Actualmente, existe evidencia suficiente sobre la relación existente entre el material particulado y diversos padecimientos. Las partículas suspendidas se han relacionado con un descenso en la función respiratoria, agravamiento de pacientes con enfermedad respiratoria y cardiovascular, alteración en los mecanismos de defensa del hospedero. Todos estos son factores que conducen a muerte prematura, sobre todo, en los sectores de población más susceptibles como son niños, ancianos y personas asmáticas. Aún se desconoce el o los mecanismos involucrados en este fenómeno, ya que el área de la toxicología ambiental en México es de creación reciente, por lo que es de suma importancia este tipo de estudios que ayuden a esclarecer los mecanismos de toxicidad de las partículas.

La Ciudad de México se encuentra subdividida en zonas caracterizadas por diferentes actividades e índice de urbanización, tiene como consecuencia que las partículas suspendidas en el aire difieran en composición dependiendo de la zona de colecta (Cicero-Fernandez et al., 1993). Resulta difícil realizar un análisis

completo de la composición de las partículas (Rosas, et al., 1995; 2001; Edgerton et al., 1999; Mar et al., 2000), por lo que se tomó la decisión de realizar una comparación entre tres diferentes fuentes de partículas, designadas como zona norte, centro y sur, analizándose su toxicidad y potencial pro-inflamatorio.

Citotoxicidad de las PM₁₀

Es importante aclarar que la comparación de datos de citotoxicidad resulta complicada, debido en parte, a que no existe ni el equipo de muestreo adecuado, ni un método estandarizado para la obtención de partículas utilizadas en ensayos de cultivo celular. Con este antecedente, algunos investigadores han optado por realizar sus ensayos utilizando lavados de los filtros de colecta, refiriendo las unidades de exposición como $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Becker et al.; 1996, Dong et al., 1996; Holian et al., 1998; Monn and Becker, 1999; Borm et al., 1999; Imrich et al., 2000), mientras que otros han utilizado las partículas barridas de los filtros en seco y las han reportado como $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Bonner et al., 1998; Alfaro, 1999). Aunado a esto, se han utilizado diferentes técnicas para la evaluación de la citotoxicidad de las partículas, como son la exclusión de colorantes (azul tripan), liberación de lactato deshidrogenasa, reducción de tetrazolio y tinción de células adheridas (cristal violeta), situación que hace más difícil su comparación.

Por lo anterior, se tomó la decisión de realizar un cambio en las unidades de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la finalidad de poder comparar entre los diferentes estudios reportados. Este cambio se pudo realizar, gracias a que se conoce el volumen final de la dilución durante los experimentos.

A pesar de la utilización de diferentes técnicas durante la evaluación de la citotoxicidad, resulta importante resaltar la existencia de una tendencia general entre los diferentes estudios epidemiológicos, donde atribuyen el efecto tóxico de las partículas a un fenómeno de contacto, entre el tamaño y carga de la partícula y la superficie expuesta de la célula, sin considerar la composición (Schwart et al., 1996; Borja, 1999). Sin embargo, algunos investigadores (Bascom et al., 1996; Mar, 2000) han señalado que la composición es un factor determinante para la toxicidad. Esto es debido a que el efecto tóxico de una partícula está determinado por su naturaleza física, química y biológica, así como por su reactividad. También influye su fuente de generación y sitio geográfico de colecta, el sitio de impactación y distribución en el tracto respiratorio, así como el grado de sensibilidad del organismo.

La toxicidad de las partículas contaminantes se ha estudiado en diferentes líneas celulares, sin que hasta el momento ninguno se hayan identificado con certeza a los componentes responsables (Becker et al., 1996; Dong et al., 1996; Holian et al., 1998; Bonner et al., 1998; Alfaro, 1999; Monn and Becker, 1999; Imrich et al., 2000).

En este trabajo, los resultados obtenidos muestran como las aeropartículas menores de 10 μm colectadas en tres zonas de la Ciudad de México son tóxicas para la línea celular J774A.1. El efecto observado fue dependiente tanto de la concentración de las partículas, así como de la zona de colecta, donde las

partículas del norte presentan una toxicidad mayor con respecto a las del centro y sur (Fig 1 A).

El hecho de que el efecto tóxico inducido por las partículas de las tres zonas de colecta haya mostrado diferencias sugiere que el daño no está dado sólo por el tamaño de las partículas, al parecer la composición de éstas tiene una relación directa con dicha actividad. Las partículas colectadas presentan un gradiente en cuanto a la concentración de metales y de endotoxinas, donde la zona norte posee los niveles más elevados, seguida por la zona centro y finalmente la zona sur.

Los resultados de este trabajo coinciden con lo encontrado experimentalmente en otras partes del mundo, donde se reporta un amplio intervalo de concentraciones de partículas como citotóxicas, lo que da una idea sobre diferencias en composición y distribución de tamaños. Holian y colaboradores (1998) mencionan que concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de partículas totales son citotóxicas. Mientras que Becker y colaboradores (1996) reportan mortalidad celular entre el 7 y 13% a concentraciones de 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Otros autores reportan concentraciones tóxicas desde 200 a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Dong et al., 1996; Imrich et al., 2000). En un estudio previo realizado con partículas de la Ciudad de México (Alfaro, 1999) se reporta que concentraciones de 160 a 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ inducen mortalidad celular del 50%, concentraciones que coinciden con las identificadas en este estudio (80 a 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Es interesante resaltar que la actividad tóxica sólo se presenta cuando las células se encuentran bajo un estado de proliferación, resultados similares a los

presentados en fibroblastos y células epiteliales (Bonner et al., 1998; Alfaro, 1999). Una explicación para este fenómeno puede ser que es precisamente en estado celular de proliferación cuando el material genético de la célula debido a sus condiciones de replicación se encuentra expuesto a diversas sustancias y puede ser más susceptible a daños irreparables que conduzcan a la muerte celular.

Uno de los principales componentes a los que se le atribuye la toxicidad del PM₁₀ son los metales de transición solubles (Dreher, 1997). Se ha observado que partículas cuyo origen es principalmente industrial o producto de procesos de combustión contienen cantidades pequeñas de compuestos orgánicos (C, H, N), mientras que metales en forma soluble como Fe, Ni, Na, Mg, Si, Ca, S, y principalmente V son abundantes, aunque también pueden presentarse como óxidos insolubles.

Con respecto al efecto tóxico de los metales, se ha demostrado la capacidad del V, As, Zn y Al para inducir rompimientos en cadena sencilla de DNA, el cuál puede ser reparable, sin embargo, el Zn es responsable de cambios irreparables en el DNA, así como muerte celular (Collery et al., 1996).

El análisis de PM₁₀ de la Ciudad de México (Bonner et al, 1998, Miranda et al., 2000), reveló que estas contienen Cu, Fe, Ni, V, Zn y Pb en niveles de μg por mg de PM₁₀. Estos datos refuerzan la hipótesis de que el efecto citotóxico probablemente se debe a la presencia de altas concentraciones de metales adsorbidos a las partículas, a su biodisponibilidad y su asociación con otros

componentes, ya que su efecto podría ser el resultado de la acción combinada de éstos, dentro de la mezcla.

Algunos estudios, consideran que las $PM_{2.5}$ tienen un efecto más tóxico, debido a que el contenido de carbón orgánico y elemental, metales, sulfatos e iones H^+ se incrementa cuando el tamaño de la partícula es menor (Dockery et al., 1993; Schwartz et al., 1994, 1996; Mar et al., 2000). También se ha señalado que esto favorece su penetración en vías respiratorias y su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno, afirmando que esta diferencia en toxicidad, se debe a la proporción de partículas pequeñas $<2.5 \mu m$ presentes en las PM_{10} de las diferentes zonas. En este trabajo se considera que la distribución por tamaños es un factor que puede influir, sin embargo, para el caso particular de la Ciudad de México, existen datos que revelan una distribución uniforme entre la fracción $PM_{2.5}$ y PM_{10} . En este sentido, Salazar y colaboradores (1992) realizaron un análisis de la distribución por tamaños para partículas de la zona sur de la Ciudad de México, en el cuál, una de sus conclusiones es que las $PM_{2.5}$ y las $PM_{10-2.5}$ contribuyen cada una con el 50% de la masa total de PM_{10} . Estudios más recientes (Edgerton et al., 1999) reportan datos similares, mientras que PICCA (1999) informa que para la zona norte el $PM_{2.5}$ constituye del 40 al 60% del PM_{10} . Castillejos y Retama (2001) muestran proporciones similares para la zona norte (Tlanepantla 61%, Azcapotzalco 51% y la Villa 54%) y para el sureste (Cd. Nezahualcóyotl y Cerro de la Estrella, 41 y 53% respectivamente). Asimismo, Rosas y colaboradores (2000) reportan que el 58% de las partículas corresponde a $PM_{2.5}$ para el noreste y 54%

para el sureste. Como se puede observar existen diferentes estudios con datos muy semejantes que demuestran que la proporción de $PM_{2.5}$ y PM_{10} es muy similar en la Ciudad de México.

Un estudio reciente ha revelado que en la zona norte de la ciudad las PM_{10} son más tóxicas que las $PM_{2.5}$, (Rosas et al., 2000). Estas observaciones sugieren la presencia de un componente o una mezcla en las PM_{10} que potencializa los efectos tóxicos de las partículas provenientes de la zona norte, y que ésta influye de manera significativa en la viabilidad celular. Resultados similares han sido reportados por Monn y Becker (1999), quienes reportan que la toxicidad está mas relacionada con PM_{10} que con $PM_{2.5}$.

Otro de los componentes importantes de las partículas a considerar en el efecto citotóxico son las endotoxinas, potentes activadores de la respuesta celular, también identificadas como responsables de la activación de caspasas, proteínas reguladoras de muerte celular. Las endotoxinas combinadas con otros compuestos pueden ejercer un efecto tóxico, el cuál ha sido reportado por Monn y Becker (1999) e Imrich y colaboradores (2000). En estos estudios se observa un aumento en la viabilidad celular cuando se utilizan bloqueadores de endotoxina; como son la proteína de unión al LPS (LBP) y la proteína neutralizante de endotoxina (ENPr). En este sentido, el análisis de cuantificación de endotoxinas realizado en las muestras de PM_{10} de las diferentes zonas, revela que existe un gradiente de concentración respecto al origen de las partículas, encontrándose los niveles más altos en las partículas del norte, seguidas por centro y sur.

Los resultados obtenidos muestran que la fracción soluble tiene un efecto tóxico moderado, siendo más evidente su participación a concentraciones por arriba de los $160 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. (Fig. 1B). Dreher (1997) señala que la toxicidad está regulada principalmente por la fracción soluble, cuando las partículas cuentan con un alto contenido de metales solubles adsorbidos. La forma soluble de los metales los hace más biodisponibles, y aunque una parte de estos iones puede ser neutralizada por la capacidad amortiguante del pulmón, en ocasiones se pueden formar partículas secundarias más tóxicas.

Sin embargo, esta no es la condición de las partículas utilizadas en este estudio, ya que el 50 % de la composición de las PM_{10} de la ciudad de México es de origen geológico, por lo que la participación de metales solubles es menor (Inventario de Emisiones a la Atmósfera 1996; Edgerton et al., 1999; Castillejos y Retama, 2001). La toxicidad observada fue mayor con la fracción insoluble, induciendo disminución de la viabilidad celular a partir de concentraciones de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, resultados que coinciden con los reportados por Imrich y colaboradores (2000).

Se sabe de la participación de los metales y endotoxinas adsorbidos en la fracción insoluble en el proceso citotóxico. Imrich y colaboradores (2000), reportaron la presencia de metales como el Mg, Al, Ti, Ni, Fe, V, y Cd asociados a la fracción insoluble, aunque no se pudo correlacionar específicamente la presencia de algunos de estos metales con el efecto tóxico, se hace referencia a su participación. Existen otros componentes presentes también en la fracción insoluble, como son las endotoxinas, las cuales, combinadas con otros

compuestos pueden ejercer un efecto tóxico, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, en este estudio al igual que otros investigadores (Amano and Akamatsu, 1991) se reporta que el LPS no induce efecto tóxico sobre la línea celular J774A.1, sin embargo se desconoce su actividad cuando esta formando parte de una compleja mezcla de partículas.

La toxicidad por partículas insolubles en macrófagos podría estar relacionada con el proceso de fagocitosis frustrada. En esta el macrófago es incapaz de engullir a la partícula entera liberando oxidantes y enzimas lisosomales en el citoplasma que originan el daño celular. Diferentes estudios han reportado la presencia de enzimas y fosfatasa ácida previo a la liberación de deshidrogenasa láctica y muerte celular (utilizando las técnicas de tinción con azul tripán, reducción de tetrazolium y fluorescencia), además de la observación de señales morfológicas de daño a mitocondria y otros organelos celulares (Blake et al., 1998).

Finalmente, fue necesario evaluar la toxicidad de las fibras de vidrio, ya que durante la obtención de las aeropartículas, no se pudo evitar el desprendimiento y contaminación con fibras procedentes de los filtros de colecta. Esto representó dos problemas: primero, la concentración de las partículas se vio afectada por la cantidad de fibras presentes, y segundo, se desconocía el efecto de las fibras sobre la línea celular. Con este mismo objetivo Dick y colaboradores (2000) realizaron un análisis sobre el efecto tóxico e inflamatorio de los seis filtros más frecuentemente utilizados durante la colecta de PM_{10} y $PM_{2.5}$. Los materiales analizados fueron fibra de vidrio, fibras de vidrio borosilicatado, celulosa, policarbonato, un copolímero vinil/acrílico y teflón. Los autores concluyen que los

filtros de teflón Gelman TF1000 son los más recomendables para análisis biológicos, ya que cuentan con una naturaleza hidrofóbica e inerte, sin producir ningún efecto inflamatorio. En este estudio resaltan la importancia del uso de extractos de filtros blancos como controles en todos los experimentos, así como la necesidad de analizar el efecto de los filtros de colecta antes de cualquier ensayo biológico.

Lamentablemente los filtros recomendados por Dick y colaboradores (2000) sólo están disponibles en membranas de 47 mm, no existen en las dimensiones que utiliza un impactador de cascada de grandes volúmenes (muestreador utilizado en este estudio). Sin embargo siguiendo las recomendaciones de los autores se procedió a analizar la toxicidad de las fibras procedentes de los filtros de colecta. Los resultados demostraron la toxicidad de las fibras de vidrio, datos que coinciden con otros ya reportados (Blake et al.,1998, Dick et al.,2000). Sin embargo, el efecto tóxico sobre las células se puede atribuir a las partículas, ya que a concentraciones menores de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ las fibras de vidrio no alteran en forma significativa la viabilidad. Además, se considera que las muestras de las tres zonas poseían una concentración similar de fibras, ya que fueron sometidas al mismo tipo de extracción, por lo que la presencia de éstas, influyeron de manera similar en las muestras. La problemática de la presencia de fibras en las muestras de partículas es un problema global, ya que actualmente en México y otras partes del mundo, no se cuenta con equipo de muestreo que reúna las condiciones necesarias para la colecta de cantidades suficientes de partículas, sin la

interferencia de un filtro, características indispensables para realizar ensayos en cultivo celular. Actualmente existe un muestreador denominado impactador de cascada de altos volúmenes ChemVol Modelo 2400, diseñado con el propósito de coleccionar grandes cantidades de partículas ambientales en un sustrato inerte (esponja de poliuretano). Para la obtención de las partículas coleccionadas es necesario realizar un lavado de la esponja, este sistema dificulta la realización de ensayos, ya que sólo sería factible utilizar las partículas coleccionadas en días independientes. Por lo anterior se plantea la necesidad de diseñar o hacer modificaciones al equipo de muestreo existente para futuras investigaciones.

Análisis de los cambios en los niveles de transcripción de RNAm para TNF α e IL-6.

En el análisis de los cambios en la expresión del RNAm para TNF α e IL-6 se eligieron concentraciones subletales de PM₁₀ (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) que no interfirieran con la extracción de RNA total, ya que a concentraciones por arriba de los 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ el RNA sufría degradación, esto debido a la capacidad de las partículas para inducir cortes en material genético, como anteriormente se había mencionado (Alfaro, 1999). Para el análisis densitométrico sólo se consideró la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ debido a que fue la que presentó la mayor expresión.

Las PM₁₀ coleccionadas de las diferentes zonas de la Ciudad de México, tienen la capacidad de inducir la expresión de genes de TNF α e IL-6 con respecto a células control. En el caso del TNF α el incremento observado fue cercano al inducido por LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No se observaron diferencias entre las zonas, lo que indica que

todas las partículas poseen la misma capacidad inductora. Estos datos coinciden con la producción de la proteína a esta misma concentración. Sin embargo, cuando la concentración se incrementa a 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se hace evidente una diferencia significativa en la secreción de la proteína.

La capacidad para inducir la sobreexpresión de $\text{TNF}\alpha$, puede estar relacionada con la presencia de metales y endotoxinas, ambos conocidos como potentes inductores.

Para IL-6 la respuesta de inducción con partículas es menor a la provocada por LPS y se puede observar una tendencia, en la cuál las partículas del sur fueron inductoras más potentes que las del norte y centro con respecto al control ($p < 0.01$). Esta observación sugiere un mecanismo de respuesta diferente al de toxicidad, en donde quizá se requiera con dosis subletales, de la penetración de la partícula a la célula. Esta propuesta se puede comprobar al evaluar la expresión de IL-6 a tiempos más prolongados, por lo que resultaría interesante también evaluar la expresión de IL-6 a tiempos más prolongados lo que plantearía que el proceso inflamatorio se mantiene después del primer contacto de la célula con la partícula.

Aunque en los datos obtenidos no se encontraron diferencias en la expresión de $\text{TNF}\alpha$ en las tres zonas, la correspondiente a IL-6 sí presentó diferencias entre las partículas de sur con respecto al centro, norte y control. Lo anterior podría relacionarse con el menor contenido de metales para esta zona, ya que una

concentración mayor de éstos podría estar actuando como secuestradores o inhibidores de los compuestos inductores (Cuadro 1).

Existen trabajos donde se ha reportado la sobreexpresión de genes inflamatorios inducidos por partículas, los datos obtenidos en este estudio, coinciden con lo reportado por Dong y colaboradores (1996) donde se demuestra la sobreexpresión del RNAm de $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y $MIP-2$ después de la exposición por 2 horas a partículas ambientales, no así con partículas de diesel. Aunque dichos autores sólo realizan un análisis cualitativo, lo que no permite comparar los datos de ambos estudios.

Resultados similares a los de este estudio son referidos por Carter y colaboradores (1997), quienes logran inducir cambios en la expresión de $IL-6$, $IL-8$ y $TNF\alpha$ con 2 horas de exposición. En el caso de $IL-6$ e $IL-8$ la expresión decae a las 24 horas, pero para $TNF\alpha$ ésta se sigue observando; se desconoce si la respuesta se mantiene o presenta un patrón de picos de expresión a diferentes tiempos de exposición. La sobreexpresión del RNAm de $IL-6$ e $IL-8$ fue bloqueada con deferoxamina, lo que indica la participación de metales (principalmente V^{4+} y V^{5+}) en dicho efecto, lo cual no es raro, debido a la naturaleza de las partículas, ya que a diferencia de este trabajo, utilizan ROFA y carecen de control positivo.

En cuanto a los niveles de expresión, Carter y colaboradores (1997) obtienen el triple de la expresión de RNAm de $IL-6$ con respecto a su control, después de la exposición a $50 \mu\text{g/mL}$ de ROFA en células epiteliales. En este estudio se reporta un incremento de $\frac{1}{3}$ respecto al control positivo (estimulación con $LPS 10\mu\text{g/mL}$)

con una exposición a 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PM_{10} del sur en macrófagos. Para el caso del RNAm de TNF reportan un incremento de 4 veces, con una exposición de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ROFA, mientras que nuestros resultados muestran un incremento de 1.4 veces más con respecto al control, después de la exposición a 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PM_{10} del sur. Como se puede observar nuestros valores están por debajo a los encontrados por otros investigadores. Sin embargo, en este estudio se utilizaron concentraciones menores (6 veces) y partículas ambientales, donde la carga de metales es inferior a ROFA, por lo que podríamos suponer una participación más importante de las endotoxinas para el caso de partículas de la Ciudad de México, además de la diferencia en sensibilidad que presentan las líneas celulares utilizadas.

También se ha reportado un incremento en la expresión de otros genes como matrilisina, definida como una metaloproteinasa que participa en el proceso inflamatorio, a través de la generación de fragmentos de matriz extracelular que funcionan como quimiotácticos de células inflamatorias, además de inducir la liberación de citocinas (Su et al., 2000). Lamentablemente no existen reportes al respecto utilizando partículas de la Ciudad de México, por lo que hacer este análisis con PM_{10} resultaría interesante.

Producción de proteínas proinflamatorias.

La cuantificación de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 en sobrenadantes de células expuestas a partículas coinciden con el encendido de estos mismos genes. A diferencia del efecto tóxico de las partículas, la producción de citocinas fue mayor para las

partículas provenientes de la zona centro (6295 pg/mL de TNF α y 167 pg/mL de IL-6), con respecto a la zona norte (4684 pg/mL de TNF α y 113 pg/mL de IL-6) y sur (4542 pg/mL de TNF α y 33.3 pg/mL de IL-6), expuestas a 120 μ g/mL de PM₁₀. En todos los casos se observa un patrón dependiente de la concentración. Con respecto a los niveles de TNF α encontrados en los sobrenadantes, estos no coinciden con los esperados, ya que la sobreexpresión en los niveles de RNAm indicaría una producción de proteína mayor equiparable a lo producido por LPS. Un reporte previo (Ribeiro et al., 1996) señala que una sobreexpresión de otras proteínas como son las de choque térmico de 70 kDa (HSP70) pueden actuar como secuestradoras de TNF e impedir su secreción al medio. Se sabe además que las partículas cuentan con la capacidad de inducir estas proteínas, lo que explicaría en parte los niveles encontrados en este estudio. Por otro lado existen otras proteínas como la α -macroglobulina con función similar de secuestradoras que pueden participar en el evento. Esta hipótesis podría confirmarse si se cuantificara TNF intracelular por citometría de flujo.

En otros estudios (Becker et al., 1996; Dong et al., 1996) los niveles de proteínas cuantificadas en sobrenadantes de células expuestas a partículas, reportan datos de 13000 U/mL de TNF en macrófagos humanos y 1200 U/mL en macrófagos de rata, expuestos a 200 y 20 μ g/mL respectivamente. Monn y Becker (1999), y Becker y colaboradores (1996) reportan también la producción de IL-6 en niveles de 3000 y 2000 pg/mL. En ambos casos la producción de citocinas fue bloqueada horneando las partículas, utilizando polimixina B o LBP, no así con deferoxamina,

responsabilizando del efecto a las endotoxinas presentes en niveles de 10 a 500 pg/mg o de 0.06 a 0.25 UE/mL. Lamentablemente no es posible comparar los datos de producción de TNF, ya que se reportan unidades diferentes, pero en el caso de IL-6 se observa que los niveles encontrados en este estudio están muy por debajo de los reportados. Lo anterior debido quizá a diferencias en la sensibilidad celular o en la composición y distribución de tamaños de las partículas.

Carter y colaboradores (1997) reportan niveles de 60 y 70 pg/mL de TNF con concentraciones de 50 y 200 μ g/mL de ROFA, así como niveles de 200 y 700 pg/mL de IL-6, siendo inhibidos con desferoxamina. En su trabajo utilizan partículas originadas de la combustión, sin embargo los niveles de TNF reportados son menores a los encontrados por nosotros, mientras que los niveles de IL-6 son mayores. Imrich y colaboradores (2000) reportan una producción de 8000 pg/mL de TNF después de la exposición a 100 μ g/mL de partículas, datos similares a los encontrados en este trabajo (6295 pg/mL de TNF α con 120 μ g/mL de partículas del centro). La producción fue asociada a la fracción insoluble de las partículas e inhibida con ENPr, lo que indica la participación de endotoxinas reportando niveles de 8.3 a 60 UE/mg, concentraciones que también coinciden con las encontradas en este estudio (41-85.6 UE/mg de partículas). Del mismo modo, sólo se logra reducir al 50% la producción de TNF cuando las partículas son horneadas, lo que indica la participación de otros compuestos diferentes a endotoxinas en la inducción de citocinas.

Los resultados anteriores relacionan la presencia de metales y endotoxinas, donde se indica que los metales presentes en las partículas también pueden participar en procesos pro-inflamatorios y no sólo tóxicos, debido a su capacidad para inducir procesos de óxido/reducción originando daño pulmonar. Los metales pueden incrementar la carga oxidativa y conducir a la activación de factores nucleares como NF- κ B, con la subsecuente expresión de genes pro-inflamatorios, como pueden ser citocinas y moléculas de adhesión reguladas por este factor de transcripción (Dreher et al., 1997). De este modo, los oxidantes producidos pueden contribuir a la activación de procesos pro-inflamatorios en macrófagos sin llegar necesariamente a un efecto tóxico. Además, un exceso de carga oxidativa puede inducir la expresión de factores de crecimiento y conducir a una remodelación de tejido y daño crónico.

También Goldsmith y colaboradores (1998), responsabilizan a los metales pesados (principalmente Fe³⁺ y Cu²⁺) de la producción de estrés oxidativo intracelular, ya que dicho efecto puede ser inhibido aunque no en su totalidad tratando a las partículas con quelantes que secuestran a los metales.

El vanadio puede intervenir directamente en los procesos de transducción de señales, debido a que actúa como un inhibidor de fosfatasa y prolonga la expresión de reguladores pro-inflamatorios controlados por NF- κ B.

Otros estudios de exposición con animales experimentales han reportado que NiSO₄ produce daño progresivo mayor al producido por Fe y V, por su capacidad

de inducir edema pulmonar severo y hemorragias en animales expuestos, efecto que se ve disminuido cuando se neutraliza o se utiliza deferoxamina.

La presencia de metales insolubles (pentaóxido de vanadio) puede estimular la liberación de citocinas (IL-1 β) pro-inflamatorias, las cuales pueden actuar sinérgicamente con otros factores, por ejemplo, las endotoxinas (Bonner et al., 1998; Imrich et al., 2000).

Con los datos anteriores se sugiere la importancia de la participación de los metales y las endotoxinas en el efecto tóxico e inflamatorio. Por este motivo se consideró importante la cuantificación de las endotoxinas en las muestras de aeropartículas, lamentablemente no se contó con un inhibidor eficiente por lo que no se pudo llegar a determinar su participación, sin embargo es un área que será explorada posteriormente.

Con esto podemos concluir que los efectos tóxico e inflamatorio son dos procesos independientes, en los cuales pueden participar las endotoxinas y los metales. Las partículas del norte son inductoras más potentes en el primero de éstos eventos, mientras que las partículas del centro tienen un efecto inflamatorio mayor. Los niveles encontrados de endotoxinas en las muestras de la ciudad de México se ubican entre 22 a 153 UE/mg de partículas, y son superiores a las reportadas por Dong y colaboradores (1996) pero son similares a las reportadas por Imrich y colaboradores (2000) en Washington, DC. Suficientes para inducir muerte y activación de macrófagos.

Actividad de sobrenadantes de células expuestas a PM₁₀.

Uno de los objetivos de este trabajo fue investigar si las proteínas producidas por monocitos expuestos a las partículas podían tener actividad biológica, por lo que se decidió realizar un ensayo de toxicidad en células sensibles a TNF α , en el cuál se observa la capacidad de los sobrenadantes para inducir muerte celular. Como se esperaba, los sobrenadantes en los que se cuantificaron las mayores concentraciones de TNF α (zona centro), fueron los más tóxicos para la línea celular sensible, por lo que se deduce que la toxicidad puede ser debida en parte al TNF α presente, aunque no se descarta la participación en el efecto tóxico de otras proteínas. La liberación y actividad del TNF α pueden tener repercusiones importantes en el desarrollo de procesos patológicos, debido a los efectos que éste puede inducir en los diferentes tejidos.

Endotoxinas y activación de macrófagos.

Las endotoxinas son parte estructural de las bacterias Gram negativas, las cuales son microorganismos que se encuentran en forma natural en el ambiente (agua, suelo, vegetales etc.), y que pueden ser liberadas a la atmósfera, generalmente adheridas a partículas de tamaños diversos durante el proceso de aerosolización y transporte. Existen estudios (Rosas et al., 1999, 2001) donde se reporta asociación entre la concentración de partículas, la concentración de bacterias Gram negativas y los niveles de endotoxinas. Los datos obtenidos en la cuantificación de endotoxinas coinciden con los reportados para la concentración de partículas, ya que es precisamente la zona norte la que cuenta con los niveles

más altos de partículas, y de bacterias Gram negativas, seguida por la zona centro y sur. Con esto podemos concluir que las endotoxinas tienen un papel importante como componente de las aeropartículas, así como en los efectos tóxicos que éstas producen. Para determinar la participación en dichos efectos fue necesario utilizar un inhibidor, por lo que inicialmente se empleó polimixina B, que está reportado como un eficiente inhibidor de LPS por otros autores (Becker et al., 1996; Dong et al., 1996; Imrich et al., 2000). Sin embargo, los experimentos no fueron reproducibles por una disminución en el poder de inhibición, relacionada con la poca estabilidad de la polimixina B. Existe una proteína recombinante neutralizadora del LPS (ENPr) con la que posteriormente se pretende trabajar.. Finalmente, la importancia de la realización de estos estudios radica en poder reunir datos experimentales que evidencien los daños celulares provocados por las partículas. Estos resultados pueden ser considerados para la modificación de estándares, aplicación de planes y programas de prevención y control de contaminantes, con la finalidad de proteger a la población, principalmente aquellos que conforman al sector sensible de la población, como son niños, ancianos y personas asmáticas.

BIBLIOGRAFIA.

Alfaro, E. (1999). Caracterización toxicológica de partículas (PM₁₀) provenientes de tres zonas de la Ciudad de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina-UNAM.

Amano F., and Y. Akamatsu. (1991). A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophage like cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. *Infection and Immunity*. 59(6):2166-2174.

Andersen Sampler Inc. (1984). Operating manual for Andersen Sampler, Atlanta.

Bascom, R., P. Bromberg, D. Costa, R. Devlin, D. Dockery, M. Frampton, W.

Lambert, J. Samet, F. Speizer, and M. Utell. (1996). Health Effects of Outdoor Air Pollution (Part 1). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153(1):3-46

Becker, S., J. Soukup, M. Gilmour, and R. Devlin. (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particles: Effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 141:637-648.

Blake, T., V. Castránová, D. Schwegler-Berry, P. Baron, G. Deye, C. Li, and W. Jones. (1998). Effect of fiber length on glass microfiber cytotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health (Part A)*, 54:243-259.

Bonner, J., A. Rice, P. Lindroos, P. O'Brien, K. Dreher, I. Rosas, E. Alfaro, and A. Osornio. (1998). Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:672-680.

Borja-Aburto, V., D. Loomis, S. Bangdiwala, C. Shy, and R. Rascon-Pacheco. (1997). Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *Am. J. Epidemiol.* 145(3):258-268.

Borja, V., M. Castillejos, D. Gold, S. Bierzwinsky, D. Loomis. (1998). Mortality and ambient fine particles in southwestern México city. *Environ. Health Perspect.* 106(12):849-854.

Carter, J., A. Ghio, J. Samet, and R. Devlin. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146:180-188.

Castillejos, M. (1992). La contaminación atmosférica y la salud: Algunas reflexiones sobre el tema. En: *La contaminación atmosférica en México, sus causas y efectos*. 1ª edición. Comisión Nacional de Derechos Humanos, pp288.

Castillejos, M., y A. Retama. (2000). Comportamiento y distribución de las partículas respirables finas y gruesas en el norte y sureste de la ciudad de México. Conserva 1999-2000. Disponible: http://sma.df.gob.mx/publica/conserva_publica/aire03.pdf.

Cicero-Fernández, P., W. Thistlewaite, Y. Falcon, and M. Guzmán. (1993). TSP, PM₁₀ and PM₁₀/TSP ratios in the México city metropolitan area: a temporal and spatial approach. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3(1):1-14

Censo General de Población y Vivienda 2000, Resultados preliminares, México 2000.

Chelly, J., and A. Kahn. (1994). RT-PCR and mRNA Quantitation. En: Mullis, K.B., Ferré, F. y Gibbs, R.A. (Eds.) *The Polymerasa Chain Reaction*. Birkhauser Boston E.U.A.

Chmcynski, P., and N. Sacchi. (1987). *Anal. Biochem.* 156-162.

Chmcynski, P. (1993). *Biotechniques.* 15:532

Coligan J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach and W. Strober. (1992). *Current protocols in immunology*. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. Supplement 14. U.S.A.

Collery, P., J. Corbeella, J. Domingo, J. Etienne, and J. Llobet. (1996). *Metal ions in Biology and Medicine*. Vol 4. Ed John Libbey. pp 19-22.

COMETRAVI (1997). *Estrategia Integral del Transporte y Calidad del Aire para la ZMVM*. Estudio 5: Definición de políticas de modernización, inspección, sustitución, eliminación definitiva de vehículos de transporte y combustibles alternos.

Dick, C., V. Stone, D. Brown, M. Watt, J. Cherrie, S. Howarth, A. Seaton and K. Donaldson. (2000). Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmospheric Environ.* 34:2587-2592.

Dreher, K., R. Jaskot, J. Lehmann, J. Richards, and J. McGee. (1997). Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health.* 50:285-305.

Dockery, D.W., C.A. Pope, X. Xu, J.D. Spengler, J.H. Ware, M.E. Fay, B.G. Ferris, and F.E. Speizer. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329:1753-1759.

Dong, W., J. Lewtas, and M. Luster. (1996). Role of endotoxin in tumor necrosis factor α expression from alveolar macrophages treated with urban air particles. *Exp. Lung Res.* 22:577-592

Doran, J.C., S. Abbott, J. Archuleta, X. Bian, J. Chow, R.L. Coulter, S.F.J. de Wekker, S. Edgerton, S. Elliot, A. Fernández, J.D. Fast, J.M. Hubbe, C. King, D. Langley, J. Leach, J.T. Lee, T.J. Martin, D. Martinez, J.L. Martínez, G. Mercado, V. Mora, M. Mulhearn, J.L. Pena, R. Petty, W. Porch, C. Russell, R. Salas, J.D. Shannon, W.J. Shaw, G. Sosa, L. Tellier, B. Templeman, J.G. Watson, R. Ehite, C.D. Whiteman, and D. Wolfe. (1998). The IMADA-AVER boundary layer experiment in the Mexico city area. *Bull. Am. Meteorological Soc.* 79(11):2497-2508.

Edgerton, S.A., X. Bian, J.C. Doran, J.D. Fast, J.M. Hubbe, E.L. Malone, W.J. Shaw, C.D. Whiteman, S. Zhong, J. Arriaga, E. Ortiz, M. Ruiz, G. Sosa, E. Vega, T. Limón, F. Guzman, J. Archuleta, J. Bossert, S. Elliot, J. Lee, L. McNair, J. Chow, J. Watson, R. Coulter, P. Doskey, J. Gaffney, N. Marley, W. Neff and R. Petty. (1999). Particulate air pollution in Mexico city: A collaborative Research Project. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 49:1221-1229.

EPA. (1997) The air quality criteria for particle matter. EPA/600/P-95/001bF. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency, 1996.

Eskandari, M.K., D.T. Nguyen, S.L. Kunkel and D.G. Remick. WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity and reliability. *Immunol. Invest.* 19(1):69-79 (1990).

Falcon, Y. (1992). La contaminación por partículas suspendidas en la atmósfera. En: *La contaminación atmosférica en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México, D.F.

Fortoul, T.I., L.S. Osorio, A.T. Tovar, D. Salazar, M.E. Castilla, and G. Olaiz, (1996). Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: Comparison of cases from the 1950s and the 1980s. *Environ Health Perspect.* 104(6):630-632.

García, P. (2000). Delegación Gustavo A. Madero, p 276-282. En: *La ciudad de México en el fin del segundo milenio*. G. Garza, Gobierno del D.F. y Colegio de México. 1ª edición, México, pp 638.

Ghio, A., J. Zhang, and C. Piantadosi. (1992). Generation of hydroxyl radical by crocidolite asbestos is proportional to surface iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:646-650.

Golsmith, C., A. Imrich, H. Danaee, Y. Ning, and L. Kobzik. (1998). Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 54:529-545.

Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson. (1996). Bacterial Modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev.* 60(2):316-341.

HEI. (2000). Health Effects Institute. Research Report. Mechanisms of Morbidity and Mortality from Exposure to Ambient Air Particles. Eds. John Godleski, Richard Verrier, Petrus Koutrakis and Paul Catalano. Number 91.

Holian, A., R. Hamilton, M. Morandi, S. Brown, and L. Li. (1998), Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ. Health Perspec.* 106(3):127-132.

Imrich, A., Y. Ning, H. Koziel, B. Coull, and L. Kobzik. (1999). Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophages tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol. App. Pharmacol.* 159:117-124.

Imrich, A., Y. Ning, and L. Kobzik. (2000). Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses *in vitro*. *Toxicol. App. Pharmacol.* 167:140-150.

INER. (1991). Informe de labores 1991, Secretaria de Salud, 98.

Inventario de emisiones a la atmósfera en la ZMVM. (1996). Editores: Ciudad de México, Comisión Ambiental Metropolitana y Secretaría del Medio Ambiente. Pp 107.

Janssen, Y., J. Marsh, M. Absher, E. Gabrielson, P. Borm, K. Driscoll, and B. Mossman. (1994) Oxidant stress responses in human pleura mesothelial cells exposed to asbestos. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149:795-802.

Kodavanti, V., R. Joskot, W. Su, D. Costo, A. Ghio, K. Dreher. (1997). Genetic variability in combustion particle-induced chronic lung injury. *Am. J. Physiol.* 272:L521-L532.

Kuenc, W., E. Silber and U. Eppenberger. (1989). Quantification of cells culture on 96 well plates. *Anal. Biochem.* 182:16.

Lang, L. (1996). Danger in the dust. *Environ. Health Perspect.* 104(1):26-30.

Lewtas, J., D. Walsh, R. Williams, and L. Dobiáš. (1997). Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses. *Mut. Res.* 387:51-63

Mar, T., G. Norris, J. Koenig, and T. Larson. (2000). Associations between air pollution and mortality in Phoenix, 1995-1997. *Environ. Health Perspect.* 108(4):347-353.

Maron, D., and B. Ames. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215.

Milton, D., A. Feldman, D. Neuberg, R. Bruckner, and Y. Greaves. (1992). Environmental Endotoxin Measurement: The Kinetic Limulus Assay with Resistant-Parallel-Line Estimation. *Environ. Res.* 52:212-230.

Miranda, J., I. Crespo, and A. Morales. (2000). Absolute principal component analysis of atmospheric aerosols in Mexico city. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 7:1-5.

Monn, C. and S. Becker. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocyte exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol. App. Pharmacol.* 155:245-252

PICCA. (1990). Programa Integral contra la Contaminación Atmosférica de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Departamento del Distrito Federal

Ramírez, J. y J. Benigno. (2000). Delegación Coyoacán, p 260-264. En: La ciudad de México en el fin del segundo milenio. G. Garza, Gobierno del D.F. y Colegio de México. 1ª edición, México, pp 638.

Ribeiro, S., J. Villar, G. Downey, J. Edelson, and A. Slutsky. (1996). Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: Evidence for TNF α posttranslational regulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

154:1843-1850.

Rosas, I., A. Yela, E. Salinas y E. Calva. (1994). Bacterias entéricas en la atmósfera. *Ciencia y Desarrollo.* XX(118):53-57

Rosas, I., A. Yela, E. Salinas, R. Arreguín, and A. Rodríguez-Romero. (1995). Preliminary assessment of protein associated with airborne particles in Mexico City. *Aerobiologia.* 11:81-86.

Rosas, I., H. McCartney, R. Payne, C. Calderón, J. Lacey, R. Chapela, S. Ruíz-Velazco. (1998). Analysis of the relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollution, and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico city. *Allergy.* 53:394-401.

Rosas, I., E. Alfaro-Moreno, C. García-Cuellar, L. Martínez-Romero, V. Torres-Flores, E. Pérez-Cárdenas, V. Gutiérrez Avedoy y A. Osornio-Vargas. (2000). Potencial tóxico y proinflamatorio de las partículas contaminantes. Un estudio experimental comparativo entre las PM₁₀ y las PM_{2.5} de dos zonas de la ciudad de México. *Proyectos Conserva* 1999-2000. Disponible:

http://sma.df.gob.mx/publica/conserva_publica/aire03.pdf.

Rosas, I., C. Calderón, E. Salinas, L. Martínez, E. Alfaro-Moreno, D. Milton, and A. Osrónio-Vargas. (2001). Animal and worker exposure to dust and biological particles in animal care houses. *Aerobiologia*. 17:49-59.

Salazar, S., L. Lemoyne, and I. Rosas. (1992). Preliminary results of size distribution airborne particles in Mexico city. *Water, Air and Soil Pollution*. 64:649-658.

Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, E.U.A.

Samet, J.M., S. Zeger, F. Diminici, F. Curriero, I. Coursac, D.W. Dockery, J. Schwartz, and A. Zanobetti. (2000). The national morbidity, mortality, and air pollution study part II: Morbidity, mortality, and air pollution in the United States. HEI Research Report, Number 94, Part II.

Santos-Burgoa y Rojas-Bracho. (1992). Los efectos de la contaminación atmosférica en la salud. En: *La contaminación atmosférica en México, sus causas y efectos*. 1ª edición. Comisión Nacional de Derechos Humanos, pp288.

Schwartz, J., D.W. Dockery, L.M. Neas, D. Wypij, H. Ware, J.D. Spelgler, P. Koutrakis, F.E. Speizer, and B.J. Ferris. (1994) Acute effects of summer air pollution on respiratory symptom reporting in children. *Am. J. Resp. Crit. Care Med*. 150:1234-1242.

Schwartz, J., D.W. Dockery, L. Neas. (1996) Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J. Air Waste Manag. Assoc.* 46:927-939.

Scudiero, P.A. et al., (1988) *Cancer Res.* 48,4827-4833.

Stringer, B., and L. Kobzik. (1998). Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): Role of preexisting inflammation and oxidant stress. *J. Toxicol. Environ. Health.* 55:31-44.

Su, W., R. Jaskot, J. Richards, S. Abramson, F. Woessner, W. Yu, and K. Dreher. (2000). Induction of pulmonary matrix metalloproteinase expression by combustion and ambient air particles. *AJP – Lung Cell. Mol. Physiol.* 279(1):L152-L160.

Suárez, (1991). *Información Científica y Tecnológica.* 11:183-206.

Villalobos-Pietrini, R., S. Blanco, and S. Gómez-Arroyo. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico city. *Atmos. Environ.* (4):517-524.

Ziccardi, A. (2000). Delegación Cuauhtémoc, p 265-270. En: *La ciudad de México en el fin del segundo milenio.* G. Garza, Gobierno del D.F. y Colegio de México. 1ª edición, México, pp 638.