



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Expresión de INF-gamma, TNF-alfa y TGF-beta en
trabajadores expuestos ocupacionalmente a BTX
(Benceno-Tolueno-Xileno)”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:
LUIS CUAUHTÉMOC HARO GARCÍA

Tutor: Víctor Hugo Borja-Aburto;

Comité Tutoral: César Raúl González-Bonilla, Rommel
Chacón-Salinas



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

REPORTE FINAL

**“Producción de IL-10, TNF-alfa e IL-12 en trabajadores expuestos
ocupacionalmente a mezcla de BTX
(Benceno-Tolueno-Xileno)”**

Autor: Luis Cuauhtémoc Haro-García;

Tutor: Víctor Hugo Borja-Aburto;

Comité Tutoral: César Raúl González-Bonilla, Rommel Chacón-Salinas

...a mi hija Gabriela

INDICE

Capítulo	Página
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	21
TABLAS.....	28
FIGURAS.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMEN

Introducción: La mezcla de Benceno-Tolueno-Xileno (BTX) puede producir efectos citotóxicos aditivos en linfocitos y monocitos circulantes. Resultados de estudios epidemiológicos sobre la respuesta inmune de trabajadores expuestos a estas sustancias son contradictorios y la información de efectos sobre la respuesta inmune innata (R.I.I.) es escasa. IL-10, TNF- α e IL-12, son parte del arsenal de la R.I.I. contra agentes externos nocivos. **Objetivo:** Determinar la relación entre exposición ocupacional a BTX y su capacidad para producir IL-10, TNF- α e IL-12 por células mononucleares periféricas (CMP). **Material y Métodos:** Estudio transversal sobre 54 trabajadores que laboran en una empresa de pinturas de la Ciudad de México, Distrito Federal; de ambos sexos, procedentes de las distintas áreas de trabajo. La exposición se estimó con base a la *dosis potencial acumulada* expresada en mg de BTX/kg de peso del trabajador/jornada de trabajo de 8hrs durante el número de meses laborados en la empresa (DPA-BTX). Se conformaron dos grupos de exposición con punto de corte en ≥ 1.0 g de DPA-BTX: DPA-BTX Alta y DPA-BTX Baja. A todos los trabajadores se les obtuvo CMP y con prueba de ELISA se midieron IL-10, TNF- α e IL-12 en pg/mL previo y posterior a estímulo con lipopolisacárido. El análisis estadístico evaluó mediante modelos de regresión lineal múltiple, la producción diferencial pre y post-estímulo con LPS de cada una de las citocinas propuestas y en su conjunto, según grupo de exposición y ajustados por tabaquismo, consumo de alcohol y sobrepeso/obesidad. **Resultados:** La concentración de benceno detectada en seis trabajadores en cinco áreas de trabajo ($3.2 - 15.4\text{mg/m}^3$), y de tolueno ($2.0 - 158.5\text{mg/m}^3$) y xileno ($2.6 - 41.2\text{mg/m}^3$) en todos los trabajadores de las diferentes áreas de trabajo fue relativamente baja. En trabajadores con DPA-BTX Alta se observó disminución en el promedio de producción de las citocinas analizadas, aunque solo en TNF- α fue significativa ($\beta = -1,196.0\text{pg/mL}$; $p = 0.01$) y en la sumatoria de las tres citocinas ($\beta = -2,550.6\text{pg/mL}$; $p = 0.02$). **Conclusión:** Pese a las concentraciones bajas de BTX, la producción por CMP de las citocinas evaluadas en trabajadores con DPA-BTX Alta es menor que en aquellos con DPA-BTX Baja, y aunque no se demostraron diferencias en la producción disminuida de IL-10 e IL-12 entre los grupos conformados, de cualquier modo ésta fue menor en las muestras de trabajadores que han estado sujetos a DPA-BTX Alta.

Palabras clave: Benceno-Tolueno-Xileno, BTX, exposición ocupacional, respuesta inmune, citocinas

INTRODUCCIÓN

Se ha señalado que la exposición por vía aérea a concentraciones de benceno desde un rango de 5-19ppm (16-61mg/m³) y más puede causar depresión de la médula ósea, en apariencia por un efecto citotóxico directo sobre todas las líneas celulares progenitoras de la hematopoyesis.¹ Pese a ello, el efecto de exposición baja a benceno y presencia de hematotoxicidad permanece controvertido.² Tiempo atrás, la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) había señalado que a un nivel de 25ppm en promedio ponderado en tiempo (*time-weighted average*: TWA) de 8 horas de benceno, no se presentaban efectos hematológicos no-malignos, y la *Agency for Toxic Substances and Disease Registries* (ATSDR) colocaba este nivel entre 10 y 50ppm (32-160mg/m³).² Sin embargo, estudios posteriores reportaron efectos hematotóxicos en niveles por debajo de las 10ppm (32mg/m³) e incluso <5ppm (<16mg/m³), además que algunos de los efectos para la salud en humanos se habían fundamentado en extrapolaciones de resultados observados en animales de experimentación.¹ Bajo este nuevo escenario, actualmente la Unión Europea considera el valor umbral límite (*threshold limit value*: TLV) en promedio ponderado en tiempo (TWA) recomendado para el benceno en 1ppm (3.2mg/m³), mientras que la ACGIH sugiere que el TLV-TWA para esa sustancia deba ser de 0.3ppm (0.96mg/m³), el *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) sostiene un valor inferior y que no debe exceder a 0.1ppm (0.32mg/m³), y la *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) ha determinado que el límite permisible de la cantidad de benceno en aire en un área de trabajo, a lo largo de las 8 horas de la jornada en una semana laboral de 40 horas no debe de sobrepasar 1ppm (3.2mg/m³).³⁻⁴

Por otro lado, la denominación de una exposición como crónica también ha sido motivo de discusión; aunque se ha determinado que una exposición intermedia, al menos a benceno, puede ser establecida entre 14 y 365 días, y una exposición crónica cuando esta es superior a los 365 días.¹ Se ha referido que cuando existe exposición ocupacional a esta sustancia por más de 55 meses en hombres y 65 meses en mujeres, y a tolueno por más de 95 meses en hombres y 73 meses en mujeres, coexiste depresión cuantitativa sostenida de linfocitos T,⁵ sin que ello se manifieste en deficiencias clínicamente demostrables en la inmunocompetencia de los trabajadores expuestos, lo que sugiere que dichos linfocitos, aunque disminuidos en número por efectos de al menos la mezcla de benceno y tolueno, son quizás plenamente funcionales.^{5,6}

Asimismo, en ambientes laborales con concentraciones de benceno <15 ppm (48mg/m³) se ha advertido depresión específica del nivel circulante de linfocitos B sin que se precise si ésta se presenta a concentraciones de benceno por debajo de 1ppm (3.2mg/m³).⁷

No obstante estas restricciones, es importante destacar la mezcla del benceno con tolueno y xileno (BTX) debido, por un lado, a que existe evidencia suficiente para suponer que estas dos últimas sustancias podrían interactuar y determinar la toxicidad que produce la fracción bencénica ya que se comparte el mecanismo toxicocinético del citocromo P450 CYP2E1 y de otras isoenzimas de este sistema,^{8,9} además de que se ha observado que la acción conjunta de tolueno-xileno por sí misma probablemente produce algunos resultados aditivos sobre la cuenta de linfocitos y monocitos circulantes;¹⁰ y por otra, que en el medio laboral, la mezcla de BTX es prácticamente ineludible.¹¹

Otros estudios epidemiológicos que se han dirigido a analizar la integridad funcional de la respuesta inmune de trabajadores expuestos ocupacionalmente a este tipo de sustancias en la última década son contradictorios, independientemente que la forma en que se determinó la exposición ocupacional sea discutible. Mientras Collins² y Rhodes¹² no identificaron modificaciones en la cuenta absoluta y diferencial de linfocitos, Tanigawa¹³ encontró disminución de subpoblación de linfocitos T en expuestos a tolueno, y Bogadi-Šare⁷ y col. en expuestos a benceno identificaron disminución de linfocitos B sin afección de la cuenta de linfocitos T ni sobre los niveles de IgM, IgG e IgA. Cabe señalar que son pocos los estudios disponibles que estuvieran dirigidos a analizar los efectos sobre componentes de la respuesta inmune innata (R.I.I.), salvo algunas referencias que señalan disminución en la cuenta de células NK, lo que dificulta establecer un juicio claro sobre los efectos de este grupo de disolventes.^{12,13}

Los efectos sobre la R.I.I. pueden ser evaluados con diversos parámetros, donde puede destacarse la producción de citocinas, entre las que se encuentran la interleucina-10 (IL-10), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleucina-12 (IL-12), ya que son un conjunto de componentes solubles que forman parte importante del arsenal inmediato de la R.I.I. que posee el humano contra virus, bacterias y/o material externo nocivo.¹⁴

La IL-10 es producida, entre otros, por monocitos activados, y entre sus actividades dominantes está el de suprimir la producción de citocinas proinflamatorias procedentes tanto de monocitos como de neutrófilos y disminuir la expresión de moléculas co-estimuladoras y activadoras de monocitos y de células dendríticas, por lo que a esta citocina se le ha caracterizado como desactivadora de macrófagos y por lo tanto como una inmunorreguladora antiinflamatoria. La IL-10 puede ser producida por monocitos al ser estimulados con lipopolisacárido (LPS) aunque esta respuesta puede ser tardía.¹⁵

TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda contra bacterias gramnegativas y otras infecciones microbianas.¹⁶ Su fuente principal son los macrófagos, y entre las acciones que genera está la inducción de moléculas de adhesión en células endoteliales, reclutamiento y activación de neutrófilos para aumentar su adhesión al endotelio e incrementar en consecuencia su actividad microbicida, estimular a otros macrófagos, inducir angiogénesis, y producir crecimiento de fibroblastos.¹⁶ Además, TNF- α juega un papel importante en la apoptosis, y se ha observado que en la limitación de su producción contribuye IL-10.¹⁶

La IL-12 es una citocina proinflamatoria que fue inicialmente reconocida como inductora de INF- γ , aunque también se le reconoce actividad inmunorreguladora.¹⁷ Es primariamente producida por células presentadoras de antígeno en etapas tempranas de la respuesta inmune que promueve la inmunidad celular.¹⁷ Aunque las células dendríticas son las más potentes productoras de IL-12, los macrófagos estimulados con LPS también son considerados fuente relevante de esta citocina.¹⁷ Puede ser también inductora de IL-10, la cual es su propia inhibidora.¹⁷

El objetivo del presente estudio fue determinar la relación entre la exposición a mezcla de BTX y la capacidad para producir IL-10, TNF- α e IL-12 por células mononucleares periféricas (CMP) de una muestra de trabajadores de una empresa productora de pinturas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Se realizó un estudio transversal en 60 trabajadores que laboran en una empresa manufacturera de pintura en la Ciudad de México, Distrito Federal, quienes fueron evaluados entre febrero y mayo del año 2007. El número total de trabajadores de la empresa sumaban 234 dispuestos en 16 áreas de trabajo. Los trabajadores fueron de ambos sexos con antecedente de antigüedad laboral de al menos cuatro meses continuos, procedentes de las distintas áreas de trabajo y en razón de la factibilidad para realizar los estudios inmunológicos y de las posibilidades de retirar temporalmente al trabajador de la línea de producción.

No fueron incluidos en el estudio las trabajadoras que cursaran con embarazo y/o aquellos que hubiesen declarado estar bajo tratamiento con medicamentos promotores de la hematopoyesis, haber sido donadores de sangre o de cualquier hemoderivado o sujeto a hemotransfusión o a cualquier hemoderivado por cualquier causa tres meses previos al estudio, declarar estar sujeto a tratamiento con esteroides, saberse y declararse con alguna enfermedad infecciosa crónica tipo tuberculosis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B ó C, o referir cualquier enfermedad autoinmune y/o saberse portador de virus de inmunodeficiencia humana. De la misma manera, fueron eliminados los individuos que acusaran presencia de probable problema infeccioso agudo a nivel de vías respiratorias altas o gastrointestinal al momento del estudio.

La información sobre la edad, denominación y permanencia del área en el que desempeña su puesto de trabajo y la antigüedad en el mismo se recolectó con la aplicación de un cuestionario a través de entrevista; asimismo, lo correspondiente a antecedente de tabaquismo al menos en el último año y su práctica actual así como el consumo consuetudinario de bebidas alcohólicas y lo correspondiente al peso y estatura del trabajador para el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC).¹⁸

La exposición se estimó a partir de muestreo personal recolectado puntualmente en las diversas áreas de la empresa y de su historia laboral. A todos los trabajadores se les tomó muestra sanguínea para realizar biometría hemática y obtener CMP, las cuales serían posteriormente estimuladas con LPS. Asimismo se les solicitó una muestra de

orina para medir nivel de ácido S-fenilmercaptúrico (ASFM), que es un metabolito del benceno.

Medición de BTX. A los trabajadores incluidos en el estudio les fueron determinadas las concentraciones de exposición (C_E) a partir de la medición personal del aire a la altura de la zona respiratoria a través de bombas que permitieron el muestreo de los vapores de benceno, tolueno y xileno a flujos menores de 500 mL/minuto y con medio de captura por medio de tubos de carbón activado de cáscara de coco de 6mm de diámetro \times 70mm de longitud con secciones de 50/100mg de material adsorbente. Las bombas se calibraban con calibrador primario antes e inmediatamente después del muestreo en campo. El tiempo base para el muestreo fue la jornada de 8 horas las cuales se cubrieron con 4 o 5 muestras recolectadas de forma continua, con cálculo para cada una de ellas del flujo de operación de la bomba y el tiempo de duración del muestreo.

Las muestras obtenidas se enviaron al Laboratorio de Salud en el Trabajo del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con sede en la ciudad de Orizaba, Veracruz, México, donde se empleó para su análisis cromatógrafo de gases marca Thermoquest Trace GC 2000[®] con detector de ionización de flama y columnas capilares para la separación de BTX.

Para el control de calidad del proceso de muestreo, se utilizaron blancos de campo, mismos que acompañaron a las muestras hasta su destino final para ser analizadas. Las dos secciones de los tubos de carbón fueron analizadas por separado y cada una de ellas por duplicado, como parte del procedimiento de control de calidad analítico, utilizando además estándares certificados trazables a NIST (*National Institute for Standards and Technology*) de cada una de las sustancia para la identificación y cuantificación de las mismas.

Estimación de Exposición Personal. La concentración promedio ponderada en tiempo (CPPT) se calculó a partir del promedio de mediciones de cada uno de los vapores de benceno, tolueno y xileno de manera personal en una jornada de 8 horas y se expresó en mg/m^3 .

De acuerdo a la propuesta hecha por Vélez-Zamora,⁽¹⁹⁾ con base en la C_E se estimó para cada uno de los 60 trabajadores la exposición a vapores de BTX por ruta inhalatoria como *dosis diaria potencial acumulada* para dicha mezcla:

$$D_{DPEmezclaBTX} = \sum D_{DPA}$$

donde $D_{DPEmezclaBTX}$ es la *dosis diaria potencial acumulada* para mezcla de vapores de BTX y $\sum D_{DPA}$ es la sumatoria de la *dosis diaria potencial acumulada* de vapores de cada uno de los componentes de dicha mezcla. Cada una de las D_{DPA} representa la cantidad de vapores en miligramos de cada uno de los disolventes contenidos en el aire inspirado y acumulado durante la jornada, de tal manera que:

$$D_{DPA} = (E_{AJ}) (V_{AI})$$

donde E_{AJ} es la suma acumulada de las concentraciones encontradas en exposiciones parciales considerando una jornada de trabajo ($E_{AJ} = \sum E_{Parcial}$ en mg/m^3 por jornada) y V_{AI} es el volumen de aire inspirado de acuerdo al puesto de trabajo, categorizado en ligero (3.5 L/min), moderado (5.0 L/min) o pesado (5.7 L/min) expresado en m^3 .^{20,21}

El estimador de dosis diaria potencial a mezcla de BTX en jornada laboral de 8 horas fue asimismo ponderado por peso del trabajador y finalmente por el tiempo laborado en la empresa, de tal manera que la dosis potencial acumulada = mg acumulados de mezcla de BTX/kg de peso del trabajador/jornada de trabajo durante el número de meses laborados en la empresa y la cual se denominará de aquí en adelante como DPA-BTX

Obtención de fórmula roja (FR), fórmula blanca (FB) y plaquetas. Previo consentimiento del trabajador, se extrajeron 5mL de sangre de cada trabajador a partir de vena del pliegue del codo, y se colocaron en tubos con 5g de EDTA (ácido etilen diamino tetracético). Las mediciones de la FR, FB y de plaquetas, así como el del perfil hemático complementario de la masa eritrocítica a través de la concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) y el volumen corpuscular medio (VCM) de eritrocitos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de

Oncología del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México, D.F., de acuerdo al manual de procedimientos correspondiente para su aplicación en Laboratorio de Análisis Clínico en el ámbito de las Unidades de Atención Médica del propio instituto. Los valores para categorizar presencia o no de hipocromia (CMHC ≤ 31.5 g/dL), linfopenia (Cuenta de linfocitos $< 1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$), plaquetopenia (Cuenta de plaquetas $< 149 \times 10^3/\text{mm}^3$) y macrocitosis (VCM ≥ 95 fL) se fundamentaron en los que señala McKenzie.²²

Obtención de CMP. Previo consentimiento del trabajador, se extrajeron 10mL de sangre total a partir de vena del pliegue del codo en tubos *vacutainer* con heparina. Bajo campana de flujo estándar, las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos Corning® de 50 mL. Cada una de las muestras se diluyó con solución de Hanks 1:2; posteriormente en otro tubo de 15 mL se realizó gradiente de densidad con solución Ficoll-Hypaque. Esta solución se centrifugó a 1,500 RPM por 30 minutos; una vez culminada la centrifugación, se recolectó el paquete de CMP a partir de la banda que presentaba aspecto turbio. Una vez separada esta sección, con pipeta Pasteur ésta se colocó en otro tubo de 15mL y se lavó con 10 a 15 mL de solución de Hanks para nuevamente centrifugarse por 5 minutos a 2,000 RPM. Una vez concluida, se eliminó el sobrenadante de solución de Hanks y se repitió el procedimiento de resuspender las células, efectuar lavado y centrifugar a 2,000 RPM por 5 minutos, con eliminación del sobrenadante.

Después de la última resuspensión se agregaron 6 mL de medio de cultivo RPMI; de esta solución se tomaron 20 μ L con micropipeta a los cuales se les adicionó y mezclaron 20 μ L de azul de tripano también con ayuda de micropipeta. Para determinar una cuenta mínima de un millón de células por muestra, de la mezcla previa se tomaron 20 μ L que se colocaron por capilaridad en la cámara de Neubauer para ser posteriormente colocada en microscopio con objetivo de 40x a fin de cuantificar celularidad en los cuatro cuadrantes. Una vez efectuada la lectura, se realizó el cálculo para obtener el número de CMP encontradas por muestra y determinar si la cantidad de monocitos se presentaba en número suficiente para ser sujetos posteriormente a estímulo con LPS.

Cuantificación de citocinas con prueba de ELISA. Para la realización de las pruebas de ELISA de cada una de las citocinas propuestas en el a estudio, en una microplaca de 24 pozos se colocó 1 mL de la solución obtenida de la última resuspensión que se llevó a efecto en el proceso de obtención de CMP. En 6 pozos les fue agregado medio de cultivo RPMI; a tres de ellos le fueron adicionados 20µL de LPS y en los otros tres no les fue agregado LPS.

La microplaca se incubó por 12 horas a 37°C para luego, con ayuda de pipeta Pasteur, se tomara el sobrenadante de cada pozo y finalmente colocarse en tubos Eppendorf para centrifugarse durante 5 minutos a 2,500 RPM en microcentrífuga.

Los sobrenadantes de los tubos ya centrifugados se tomaron con ayuda de pipeta Pasteur y se colocaron en otros tubos Eppendorf que se mantuvieron refrigerados a -4°C hasta el momento de cuantificar las citocinas de interés. Esto último se realizó en microplacas de 96 pozos en las que se colocaron 100 µL de anticuerpo de captura diluido 1:250 a cada pozo y se incubó a +4°C por 12 horas; el contenido de los pozos fue retirado y se efectuaron tres procedimientos de lavado a cada pozo con 300 µL de solución. En el último lavado se secó la microplaca con papel absorbente para remoción de residuos del propio lavado. Las microplacas se bloquearon agregando 200 µL de solución diluyente en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por una hora para nuevamente realizar el procedimiento de lavado mencionado previamente.

La curva tipo se preparó de acuerdo a la citocina a cuantificar. Para ello se colocaron 100 µL de la curva tipo y 100 µL de la muestra en los pozos de la microplaca y se incubó de nueva cuenta a temperatura ambiente por 2 horas. El procedimiento de lavado ya mencionado se repitió por 5 ocasiones y posteriormente se agregaron 100 µL del anticuerpo de detección más enzima *streptavidin-horseadish peroxidase conjugate* en los pozos de la microplaca.

Nuevamente se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se efectuaron siete lavados. Una vez concluido lo anterior, se agregaron 100 µL de la solución de sustrato a cada pozo, se incubó la microplaca a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad; al término de esta incubación se agregaron 50 µL de solución STOP (ácido fosfórico o sulfúrico) y se leyó la absorbancia a 450 nM en lector de ELISA®. Con los

datos de absorbancia se realizó el cálculo correspondiente para obtener la concentración de cada citocina en picogramos (pg) por mL.

Tanto la obtención de CMP como la cuantificación de citocinas se realizaron por un alumno adiestrado expresamente para ello y ambas pruebas se realizaron en el laboratorio del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional.

Medición de ácido S-fenilmercaptúrico (ASFM) A cada uno de los trabajadores incluidos en el estudio les fue solicitada una muestra de orina preferentemente al final de la jornada semanal de trabajo sin importar la hora de la recolección y a partir de cual de manera inmediata se tomaron 5mL en viales expresamente para su colección y los cuales contenían 50µL de 7.5M de ácido clorhídrico con fines conservadores. Una vez recolectadas las 60 muestras, éstas se enviaron al laboratorio *AB Biomonitorig Ltd*, con sede en *Cardiff Medicentre, Heath Park, Cardiff CF14 4UJ*, Reino Unido de la Gran Bretaña, donde fueron sujetas a prueba de ELISA y a partir de la razón de nM/L de ASFM/mg/dL de creatinina se cuantificó finalmente en µM de ASFM/M creatinina. La correlación de la prueba de ELISA evaluada con la prueba de cromatografía de gases/espectrómetro de masas reportada por el laboratorio de referencia se ha establecido en 0.92.²³

Análisis estadístico. Los resultados del cuestionario, las concentraciones de citocinas estimuladas y no estimuladas con LPS, lo correspondiente a las concentraciones promedio y acumuladas de benceno, tolueno y xileno así como la de diversos estimadores, y el que se refiere a la dosis diaria potencial acumulada de exposición a mezcla de BTX en jornada laboral de 8 horas y por el número de meses laborados en la empresa de los trabajadores bajo estudio así como los valores de ASFM, se recolectaron en base de datos del programa Stata versión 10.0

En forma general se exploró la base de datos a fin de determinar presencia de valores aberrantes, extremos o perdidos, y efectuar el análisis descriptivo de las variables incluidas; posteriormente se llevó a cabo correlación simple de la producción de cada una de las citocinas evaluadas y de la producción conjunta de éstas, con la DPA-BTX (Fig. 1). Se establecieron dos grupos de exposición con punto de corte en

≥ 1000 mg o 1.0g de DPA-BTX con base a tres criterios: 1) La media geométrica de la distribución de valores del estimador referido anteriormente: 999.6 mg; 2) Los valores de concordancia más alta entre DPA-BTX en ≥ 1.0 g y las áreas que utilizan y no utilizan disolventes orgánicos en el proceso de trabajo: *kappa* de 0.56 (concordancia moderada–sustancial según Landis y Koch, moderada–buena según Altman y casi buena según Fleiss)²⁴ y 77.8 de porcentaje de concordancia; y 3) El punto de intersección entre la distribución de los valores de DPA-BTX transformados a logaritmos naturales entre áreas que utilizan o no utilizan disolventes orgánicos en el proceso de trabajo. El punto de intersección fue en aproximadamente 7.0 el cual corresponde a 1,096.63 mg de DPA-BTX.

A partir del establecimiento del punto de corte mencionado se realizó el análisis bivariado de la producción de las tres citocinas y de la conjunta de ellas entre los grupos de exposición antes mencionados, asimismo por las variables de control de antecedente de tabaquismo positivo, consumo consuetudinario de alcohol e IMC.

Se probaron modelos de regresión lineal múltiple con la producción diferencial de IL-10, TNF- α e IL-12 y el conjunto de la producción de éstas por CMP pre y post-estímulo con LPS. En todos los modelos se incluyeron y probaron las respectivas interacciones con tabaquismo, consumo de alcohol, y el IMC con el la DPA-BTX ya señalado. Para evaluar la calidad del modelo se calculó prueba de F y coeficiente de determinación R^2 ; de la misma manera los modelos fueron sujetos a análisis para observar si cubrieron los supuestos de ausencia de multicolinealidad (promedio de factor de inflación de la varianza (vif: *variance inflation factor*), homosedasticidad con prueba Breusch-Pagan/Cook-Weisberg y prueba de Shapiro-Wilks para comprobar la normalidad de la distribución de los valores residuales. El poder de cada uno de los modelos se calculó a través del programa PASS (*Power Analysis and Simple Size*: <http://www.ncss.com/pass.html>).²⁵

Por último se probaron modelos de regresión lineal múltiple de la producción de las tres citocinas y el conjunto de ellas con las concentraciones de ASFM como variable independiente en su condición de ser un marcador de exposición reciente.

Aspectos éticos. El proyecto estuvo sujeto al Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social; fue autorizado en todas sus partes y registrado con el número 2005-785-175. El protocolo correspondiente incluía el consentimiento informado y fue calificado como de riesgo mínimo ya que incluyó colección de orina y existió extracción de sangre por punción venosa en adultos en aparente buen estado de salud.²⁶ Todos los resultados han estado a disposición y hecho del conocimiento de cada uno de los trabajadores y de los departamentos de Salud y Seguridad en el Trabajo de la empresa que fue sujeta a estudio ya que los trabajadores asalariados son considerados dentro de los grupos vulnerables donde los aspectos éticos relacionados al manejo de la información deben ser con extremado cuidado.²⁷

Financiamientos: El estudio recibió apoyo financiero por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social: **2004-C01-077**, del Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS): **2005/1/1/162**, y del CONACyT por medio del programa de “Apoyos integrales para la formación de doctores en ciencias” 2006: **I0006-2006-01**

RESULTADOS

El análisis final de las tres citocinas solo se constituyó de los datos obtenidos de las muestras de 54 trabajadores debido a que en 4 de ellos no existió respuesta por parte de las CMP al estímulo de LPS o bien la respuesta resultó aberrante; dos más fueron excluidos debido a que no se pudo recolectar la información respecto a los meses totales laborados en la empresa. La producción de citocinas por CMP que se tomó en cuenta para el análisis final fue la diferencia entre la producción previa y posterior al estímulo con LPS. Este mismo análisis incluye la suma de producción diferencial de las tres citocinas bajo el concepto que éstas respondieron al mismo estímulo, en este caso LPS, el cual actúa presumiblemente sobre el *Toll Like Receptor-4* (TLR-4)^{28,29} de las CMP extraídas a los trabajadores.

Características de la población y de la empresa. La media de edad de los 54 trabajadores estudiados fue de 36.25 ± 6.9 años (*rango*: 19 – 49); en su totalidad, la mediana de antigüedad en la empresa fue de 54 meses (*rango*: 6 – 300); 25% de los trabajadores tienen 192 meses o más laborando en la misma empresa; 79.6% mencionaron consumo consuetudinario de alcohol y 50% refirieron tabaquismo positivo; 48.5% refiere la práctica conjunta de estas adicciones; sólo 18.5% refirió no llevar a cabo ninguna de éstas.

El promedio de edad, antigüedad en la empresa y del índice de masa corporal (IMC) según grupo de DPA-BTX se muestran en la Tabla I; en la misma, se exhiben las diferencias proporcionales de quienes refirieron tabaquismo positivo, consumo de alcohol y que poseen $IMC > 25$. Como puede observarse, los trabajadores de mayor edad, y en consecuencia con aparente mayor antigüedad, son los que integran el grupo de trabajadores con DPA-BTX alta ($\geq 1.0g$ de mezcla de BTX/kg de peso del trabajador/jornada de trabajo \times meses laborados en la empresa), además de presentar sobrepeso u obesidad en proporción mayor que el grupo de trabajadores con DPA-BTX baja, aunque en éstos también el promedio de $IMC > 27$. La práctica de tabaquismo y el consumo consuetudinario de alcohol no presentó diferencias entre los grupos de exposición.

Por lo que respecta a la empresa, se identificaron doce áreas de trabajo: resinas, pintura base solvente, envasado de pintura base solvente, almacén de tambores,

desarrollo de fórmulas, control de calidad, almacén de producto terminado, pinturas emulsionadas, mantenimiento, secantes, “*spitefire*” y almacén de polvos. Las primeras seis áreas, donde se desempeñan 29 trabajadores (54%), se utiliza tolueno y xileno en el proceso de trabajo, y refirió la empresa no se emplea benceno. Las últimas seis áreas, donde se desempeñan 25 trabajadores (46%), son áreas referidas que no utilizan BTX ni otros disolventes en el proceso de trabajo.

Como puede observarse en la Tabla II, en todas las áreas de trabajo se pudo determinar la presencia de vapores de tolueno y xileno, mientras que el benceno se detectó en cinco de sus áreas, una de ellas referida como no utilizar ninguno de estos disolventes. De cualquier manera la existencia de vapores de benceno, tolueno y xileno, en las áreas de trabajo señaladas que no utilizan estos disolventes en el proceso de trabajo se detectaron en concentraciones ostensiblemente menores que en las seis áreas donde sí se hace referencia de uso de estas sustancias.

Bajo este escenario se midió la eliminación de ácido *S*-fenilmercaptúrico (ASFM) en orina de los trabajadores estudiados. En todos ellos se detectó dicho metabolito; el 83% presentó $\geq 1.7 \mu\text{M}$ de ASFM/M de creatinina, nivel promedio relacionado con posible exposición ocupacional a benceno (Fig. 1). Los valores de ASFM no presentaron correlación con los del estimador de exposición a dosis diaria de mg de mezcla de BTX/jornada de trabajo (Fig. 3). Dicho estimador no considera la antigüedad en meses laborados en la empresa bajo el supuesto que el metabolito de referencia es un marcador de exposición reciente, a lo sumo de una semana previa. No obstante, se analizó la eliminación de ASFM por grupos de DPA-BTX donde si se consideró la variable antigüedad en la empresa. El promedio del nivel de ASFM presentó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con DPA-BTX alta y baja de BTX (Fig.2); aquellos sujetos a DPA-BTX alta presentaron un promedio de eliminación de ASFM más elevado aunque en ambos grupos fue por arriba de $1.7 \mu\text{mol}$ de ASFM/M de creatinina.

Características hematológicas de los trabajadores. En general no se observaron diferencias en los valores eritrohemáticos (CMHC y VCM), leucocitarios (número de leucocitos / mm^3 y número absoluto de linfocitos/ mm^3) y de plaquetas entre los grupos de exposición (Tabla III). Sin embargo, llama la atención la presencia de un número

menor de leucocitos/mm³ en trabajadores con DPA-BTX alta ($p= 0.06$) y de mayor proporción de leucopenia acompañada de linfopenia, aunque éstas no resultaron con diferencias estadísticamente significativas. Deben señalarse las proporciones relativamente altas de macrocitos (VCM ≥ 95 fl/eritrocito) en ambos grupos de exposición.

Concentración de citocinas según dosis de BTX. La concentración de cada una de las tres citocinas evaluadas en el estudio y la suma de éstas, pese a que gráficamente muestran declinación gradual de dicha concentración a mayor DPA-BTX, no mostró correlación lineal estadísticamente significativa (Fig. 3). Sin embargo, la diferencial de producción de las citocinas propuestas previo y posterior al estímulo con LPS de CMP de los trabajadores estudiados por grupos expuesto a DPA-BTX Baja y Alta a partir del punto de corte propuesto de ≥ 1.0 g y que se presentan en la Tabla IV, muestra otra perspectiva de análisis. Aunque la IL-10 y la IL-12 no presentan en estricto diferencias significativas, éstas pueden considerarse como marginales. TNF- α y la suma de producción de las tres citocinas sí presentaron claras diferencias.

Resultados del modelaje estadístico. Los modelos de regresión lineal múltiple que incluyeron el consumo de alcohol, tabaquismo+ y el IMC como variables de ajuste, mostraron que el primero de éstos disminuye la producción de las tres citocinas y la suma de éstas, sin embargo el tabaquismo presenta resultados controvertidos: disminuye el promedio de producción de IL-10 y TNF- α , pero aumentan el de IL-12 y el de la suma de las tres citocinas. La participación del IMC en unidades de cambio de producción de las tres citocinas y en la suma de éstas resultó baja. Salvo en la disminución del promedio de producción de IL-12, donde la contribución de consumo consuetudinario de alcohol resultó estadísticamente significativa ($p= 0.02$), las demás variables de ajuste no la demostraron. En trabajadores expuestos a DPA-BTX ≥ 1 g se observó disminución tanto en el promedio de producción de cada una de las citocinas propuestas como en el total de ellas, aunque solo fue significativa en el caso de TNF- α y el de la suma de las tres citocinas estudiadas (Tabla V).

Los coeficientes de determinación de IL-10, TNF- α , IL-12 y de la suma de las tres citocinas fueron de 7%, 14%, 17% y 15% respectivamente; asimismo, el poder de

los correspondientes modelos ($1 - \beta$) resultaron en 0.51; 0.84; 0.94 y 0.88. En el mismo orden, la prueba F para significancia de las interacciones fue de 0.87, 0.56, 0.81 y 0.86 y la prueba de Breusch-Pagan/Cook-Weisberg resultó en 0.04, 0.002, 0.00001 y 0.006; para los cuatro modelos, el promedio de VIF (*Variant Inflation Factors* para multicolinealidad) fue de 1.11 (<10.0) y la prueba de Shapiro-Wilks en 0.38. Con ello se dieron por cubiertos los supuestos de homosedasticidad, ausencia de multicolinealidad y normalidad de los residuales.

También fueron probados modelos de regresión lineal múltiple tomando en cuenta a la concentración de ASFM eliminado por orina como un marcador de exposición reciente y la producción de cada una de las citocinas evaluadas y la que se produjo de manera conjunta. Todos los modelos ajustados por IMC, consumo de alcohol y tabaquismo positivo mostraron disminución de la producción de cada una de las citocinas y de la sumatoria de éstas por cada unidad de cambio de ASFM: -107.43, -148.43, -207.15 y -463.02 pg/mL para IL-10, TNF- α , IL-12 y la producción conjunta de las tres citocinas respectivamente, aunque ninguna fue estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

De manera general, nuestro estudio evidenció que la producción por CMP de las tres citocinas evaluadas en trabajadores sujetos a DPA-BTX Alta es menor que en aquellos que han tenido DPA-BTX Baja, y aunque en estricto no se demostraron diferencias en la producción disminuida de IL-10 e IL-12 entre los grupos estudiados, de cualquier modo se observó que ésta producción es menor en las muestras procedentes de trabajadores que han sido sujetos a DPA-BTX Alta. Estos resultados podrían ser percibidos como parte de una respuesta integral de este conjunto de componentes solubles a la exposición crónica de mezcla de BTX, con disminución más patente sobre la producción de TNF- α , la cual es una de las principales citocinas de las definidas como proinflamatorias.¹⁶

Si bien en la IL-10 se ha observado que puede conservar una respuesta tardía, y permanecer esta a pesar de ya no existir estímulo, como en este caso a LPS,³⁰ y que existen elementos en nuestro estudio que hablan de la conservación en la producción de IL-12, cabría la posibilidad que estos se constituyeran en mecanismos compensatorios ante la declinación de TNF- α , quizás debido a que esta citocina sea más susceptible a la exposición crónica a BTX lo que se constituye en punto a ser indagado con mayor acuciosidad. En ello se ha referido que las citocinas proinflamatorias aumentan cuando la IL-10 se inhibe, y esas mismas se suprimen cuando se estimula la producción de esta última citocina.³¹

Lo anterior parece reafirmarse al identificar que ésta disminución en la producción del citado grupo de citocinas permanece al ajustarse esta asociación por consumo de alcohol, tabaquismo y presencia de sobrepeso u obesidad, y que bajo este marco de análisis, la declinación de producción de TNF- α es mayor que la de IL-10 e IL-12. Aun así debe señalarse que esto solo se limita ante el estímulo de CMP con LPS y no se toman en cuenta otros complejos mecanismos de la respuesta inmune del huésped que podrían estar conservados lo que permite mantener el delicado balance de la producción de estos componentes.^{32,33,34} Igualmente, debe de tomarse en cuenta que existe la posibilidad de que las CMP de los trabajadores que se incluyeron en el estudio hayan desarrollado lo que se ha denominado como tolerancia a LPS, el cual es un

fenómeno considerado de adaptación de la respuesta inmune del huésped, aunque esta sea temporal, y la cual incluye reducción en la reactividad de los monocitos.^{30,35}

Estos hallazgos en la producción disminuida de IL-10, TNF- α e IL-12 por parte de CMP, se ven reforzados con los resultados observados en la biometría hemática convencional que se efectuó a los trabajadores estudiados tanto en la FR como en la FB. En la primera, la destacada proporción de macrocitos entre trabajadores que han sido sujetos a DPA-BTX Alta, lo cual concuerda con otras observaciones que lo asocian a efectos sobre la FR debida a exposición a disolventes orgánicos. En la segunda, la mayor frecuencia de leucopenia acompañante entre trabajadores que han estado sujetos a DPA-BTX Alta, está acorde con múltiples señalamientos en la literatura en la cual se adjudica el decremento en la cuantía de glóbulos blancos a la exposición crónica a disolventes orgánicos.^{2,6,8,36,37} De acuerdo a lo anterior, el panorama general que describe el análisis y seguimiento de los parámetros que arroja la biometría hemática convencional, serían de suma utilidad en la vigilancia de aparición de posibles efectos tempranos debidos a exposición a mezcla de BTX.^{36,38,39}

No obstante, en el establecimiento de los anteriores enunciados debe considerarse que éstos se están sustentado, al menos en nuestro estudio, en una lectura acumulada de muestreo personal de vapores de BTX realizado sobre un grupo de trabajadores en una jornada completa de trabajo, acompañado de un análisis puntual de producción de TNF- α , IL-10 e IL-12 por CMP que a los mismos se le extrajeron, y posterior a ser estimuladas con un PAMP (Patrón molecular asociado a patógenos) específico, en este caso, LPS. Asimismo debe señalarse que las evidencias encontradas podrían ser por efecto únicamente de la fracción bencénica y no por su mezcla con tolueno y xileno, ya que se ha descrito que ante los hallazgos encontrados como los del presente estudio, debe de pensarse en primer lugar en efectos secundarios causados solo por exposición a benceno.^{1,8}

En este sentido, debe recordarse que en todos los trabajadores incluidos en el estudio presentaron concentraciones, aunque muy bajas, de ASFM y en promedio ésta fue mayor en trabajadores que se desempeñan en áreas donde se refiere el uso de BTX en el proceso de trabajo. En nuestro estudio, al tomar en cuenta a este metabolito como exposición en el análisis de producción de las citocinas propuestas, igualmente existió

disminución de éstas aun sin tomar en cuenta la exposición retrospectiva, por lo que lo comentado en el párrafo anterior, sobre la supremacía o exclusividad del benceno en la generación de efectos hematoinmunológicos, no debe de dejar de considerarse.^{1,8} El contrapunto surge cuando se intenta relacionar la producción de ASFM, que es un marcador de exposición reciente, con efectos que se señalan como crónicos, hecho que limita su contundencia.⁴⁰

Por otro lado, debe recordarse que la macrocitosis observada es considerada como muy leve, ya que el punto de corte del VCM que se estipuló fue de ≥ 95 fL por eritrocito, además que esta condición está también relacionada con el consumo crónico de alcohol, e incluso se le ha considerado como un indicador de este tipo de práctica.⁴¹ No debe soslayarse que este dato sobre el volumen eritrocitario colectado de manera única, y pese a que fue medido de manera automatizada, puede ser también calificado como espurio en tanto no haya otras pruebas o evidencias que confirmen esta situación, incluidas la deficiencias de vitamina B12, ácido fólico o hierro.⁴²⁻⁴⁴

En cuanto a la FB, la proporción de trabajadores con linfopenia por arriba del 10% de la muestra estudiada, así como lo que respecta a la presencia de hipocromia, tanto en aquellos trabajadores sujetos a DPA-BTX Alta como Baja, deberían de cualquier modo alertar para establecer mecanismos de vigilancia mas estrecha sobre este resultado de la biometría hemática general sin excluir los posibles cambios que se presenten sobre plaquetas, hecho que no fue observado en la muestra de trabajadores incluidos en el estudio.

Se destaca la importancia de la visita a la empresa como herramienta fundamental y orientadora para determinar grupos similares y vulnerables de exposición, ya que con ella fue posible que en nuestro estudio se identificaran áreas de trabajo donde se refirió el uso de los disolventes BTX y aquellas en las que presumiblemente no se utilizan en el proceso de trabajo,⁴⁵ de hecho, esta situación se constituyó en un criterio muy sólido para de ahí establecer los grupos de exposición en función de la DPA-BTX y con ello elaborar el análisis ulterior. Asimismo, se pudo observar que la contigüidad estructural que presentan éstas áreas y las posibles reverberancias de las fuentes de exposición, explicarían en gran parte el por qué los trabajadores que se desempeñan en áreas donde se refirió el no uso de estos disolventes

en el proceso de trabajo, de cualquier manera mostraron presencia de tolueno y xileno en el muestreo personal, y en algunos casos incluso mezclados con benceno aunque en todos ellos se detectaran a niveles considerablemente más bajos. Este hallazgo se vio reforzado con la presencia de ASFM en orina de todos los trabajadores sujetos a estudio. La identificación de estos puntos se constituye en una observación de gran valía a tomarse en cuenta por la empresa que tenga como propósito el confinar mejor las áreas donde efectivamente se utilizan disolventes orgánicos en sus diferentes procesos de trabajo y adicionar otras medidas preventivas de diverso orden.

El estimador utilizado presenta ventajas sobre el uso de otros que se han utilizado en diversos estudios en la literatura,^{2,7,12,13,46-48} ya que se fundamentó en la exposición acumulada en forma de dosis potencial y no en exposiciones promedio ponderadas en tiempo—que en principio no permiten considerar el efecto sumatorio de la mezcla ya que hubiera sido necesario contar con otras variables del ambiente de trabajo—, de ser aplicado a una mezcla y no basado en el análisis de cada uno de sus constituyentes en forma independiente, el haberse constituido a partir de la posible aditividad del benceno con tolueno y xileno para ejercer efectos sobre los componentes celulares y solubles que fueron sujetos a análisis y destacarse que se ha estipulado como una mezcla simple en la que se debe profundizar su estudio de acuerdo a lo que determina la *National Occupational Research Agenda* propuesta por NIOSH.¹¹ Otros factores incluidos en el estimador de referencia y que lo robustecen fueron el ponderarse por el peso de cada trabajador, el volumen de aire inspirado según si el trabajo a desarrollar era ligero, moderado o pesado, y la antigüedad en la empresa, lo que en su conjunto permiten a nuestro juicio, una visión más amplia en términos de contacto crónico con la mezcla de disolventes en estudio en función de una dosis potencial.⁴⁵

Pese a todo ello, este estimador solo consideró la exposición adquirida por vía aérea de vapores de dicha mezcla e introducidos por ruta inhalatoria del trabajador, sin tomar en cuenta posibles interacciones con otros disolventes presentes en el ambiente de trabajo.¹⁹ Además, no debe de olvidarse que el estimador propuesto tuvo la intención de contar con una dosis acumulada para evaluar la exposición retrospectiva, y para ello se contempló únicamente el tiempo de haber trabajado en la empresa por parte del trabajador, sin tomar en cuenta las fluctuaciones en esta exposición, cambios en el procesos de trabajo, cambios sustanciales en el desempeño de las actividades por puesto

de trabajo entre otros, pese a que existe el antecedente que los trabajadores prácticamente no han cambiado de área de trabajo. La subrogación de la exposición en forma retrospectiva exclusivamente con el tiempo de haber laborado en la empresa debe ser considerada con extrema cautela ya que estos eventos se han referido como no necesariamente correlacionados.⁴⁹ Además, la dosis fue establecida como potencial, que podría no ser del todo representativa de la dosis interna y en mucho menor grado de una dosis efectiva.⁴⁵

Los resultados globales del estudio permiten establecer que a DPA-BTX relativamente baja, provocan de cualquier manera cambios sutiles en la producción de un conjunto de citocinas, y que pese a esos cambios adjudicables a dicha exposición, probablemente estos componentes solubles conservan su balance. Esto podría postular que en el análisis de dichos componentes, al menos en escenarios semejantes, deben ser consideradas tanto la producción de citocinas proinflamatorias como la de antiinflamatorias y de reparadoras.

El estudio constó de una muestra de trabajadores de promedio de edad relativamente joven y en quienes podría asumirse existe un status inmunológico bien desarrollado, en el que existen factores genéticos o ambientales que lo pueden influenciar.⁵⁰⁻⁵³ Por ello, además de considerarse el tiempo promedio de exposición estrictamente ocupacional relativamente prolongado a la mezcla bajo estudio, debe incluirse la contribución de otros factores, como la coexistencia importante de tabaquismo, en el cual la nicotina, considerado el mayor constituyente del humo de cigarro, se ha asociado con supresión de un amplio rango de parámetros inmunológicos en modelos animales y en humanos,⁵⁵⁻⁶⁰ además del consumo crónico de alcohol, que se ha señalado como un potente activador, aunque en otros momentos como inhibidor, de diversas funciones de las células fagocíticas, básicamente las proinflamatorias,⁶¹⁻⁶⁵ así como la concurrencia de sobrepeso u obesidad en una considerable proporción de los trabajadores estudiados, y que son condiciones que participan en la producción de adipocitocinas proinflamatorias, incluida de forma notable la producción de TNF- α , la cual se ha demostrado que interviene en la activación de la cascada inflamatoria y con ello contribuir al desarrollo de obesidad, misma que ha sido referida como un estado de inflamación de bajo grado donde el tejido adiposo representa un sitio importante de activación de la R.I.I.⁶⁶⁻⁶⁹

Sin embargo, en nuestro estudio esas condiciones no mostraron intervenir de manera relevante en la producción de IL-10, TNF- α e IL-12 por parte de CMP al ser estimuladas con LPS, aunque no debe dejarse de mencionar que por consumo de alcohol la tendencia en la producción de esos componentes solubles fue a la disminución, el del tabaquismo se mostró de manera mixta y en mucho menor cuantía, y los cambios influenciados por el IMC son casi imperceptibles.

La información relacionada con los efectos inmunomoduladores de diversas sustancias químicas en humanos ha cobrado amplio interés al menos en la última década.^{50,70-73} En el ambiente de trabajo que fue sujeto a estudio, es posible que existan otros factores exógenos que no fueron incluidos y que pudieron ser considerados como factores adicionales de exposición, tales como la presencia de otro tipo de disolventes, entre ellos etanol y cetonas, el realizar dobles turnos laborales, uso de disolventes para el aseo de las manos del trabajador al concluir la jornada de trabajo, uso correcto del equipo de protección personal durante la elaboración de pinturas, ventilación del sitio de trabajo, el uso de disolventes en el hogar, la exposición ambiental urbana adicional, y que en el presente análisis solo se tomó en cuenta la ruta inhalatoria;⁷⁴ asimismo, dentro de los factores endógenos debe contemplarse las condiciones individuales del estado de nutrición y la capacidad metabólica de cada individuo, entre ellas la calidad del funcionamiento hepático para biotransformar la sustancias que integran la mezcla de disolventes en estudio así como lo que respecta a lo renal y su capacidad de aclaración y eliminación de metabolitos de los componentes de BTX, y la calidad y variabilidad de la respuesta inmune en forma de componentes solubles producidos por CMP cuando son estimuladas con un PAMP ya conocido.^{61,75,76}

Se ha advertido que el sistema inmunohematológico es como cualquier sistema fisiológico con una capacidad de “*reserva*” sumamente elástica,⁵¹ de manera tal que la exposición a agentes nocivos a dosis muy bajas, no ha sido posible demostrar que posea efectos inmunotóxicos contundentes.^{1,8,38,39,51,77} Aunque demostrar la inhibición de la síntesis de algunas citocinas en los trabajadores expuestos a mezcla de BTX es importante, para hablar en términos de inmunosupresión deben ampliarse estudios que analicen la síntesis de proteína C reactiva (PCR) por CMP y su inducción por TNF- α y otros mediadores inflamatorios, la velocidad de sedimentación globular, el análisis de la

producción de estrés oxidativo, de la capacidad fagocitaria de polimorfonucleares y de la participación de polimorfismos entre otros.⁷⁸⁻⁸³

Las aportaciones obtenidas en el presente estudio no son tan definitivas como para consolidar la idea que existe una inmunosupresión crónica de bajo nivel y son difícilmente extrapolables a trabajadores de empresas productoras de pinturas que se exponen de manera crónica a disolventes orgánicos en virtud que solo se indagó un aspecto de los muchos que deben explorarse, sin embargo se constituye en un punto que advierte sobre la necesidad de analizar mas a fondo, en consonancia con otras investigaciones, para determinar la exacta inmunotoxicología del evento de referencia para que a partir de ello se conformen, por un lado, prácticas preventivas en la industria como la que estuvo sujeta a estudio, y por otra, estudios dirigidos a aclarar la inmunosupresión inducida por exposición a sustancias químicas.^{70,84,85}

Tabla I. Características generales de la población estudiada

	Trabajadores con DPA-BTX Baja ($<1\text{g}$) [†] n= 30	Trabajadores con DPA-BTX Alta ($\geq 1\text{g}$) [†] n= 24	<i>p</i>
Edad en años [¶]	34 \pm 5.8	39.1 \pm 7.2	0.006
Índice de Masa Corporal (IMC) [¶]	27.8 \pm 4.0	27.7 \pm 1.8	0.93
IMC>25	70.0%	95.8%	0.03
Tabaquismo (+)	53.3%	45.8%	0.58
Consumo de alcohol (+)	83.3%	75.0%	0.51
Antigüedad en la empresa (meses) [†]	27.5	184	0.0001*

[¶]media y DE; [†]mediana; *Prueba de Mann-Whitney; [†]Estimador de dosis de BTX en mg/kg de peso por jornada de trabajo \times número de meses laborados en la empresa

Tabla II. Concentración promedio ponderada en tiempo (CPPT en jornada de 8 horas) de vapores de BTX en muestreo personal de trabajadores según áreas de producción donde labora en la empresa

		ÁREAS												
		No utilizan BTX en el proceso de trabajo						Utilizan BTX en el proceso de trabajo						
		Almacén de polvos	Spitfire	Secantes	Mantenimiento	Almacén de producto terminado	Pinturas emulsionadas	Control de calidad	Desarrollo de fórmulas	Almacén de tambores	Envasado pinturas base solvente	Pintura base solvente	Resina	PROMEDIO TOTAL
Benceno	CPPT- mg/m³	---	---	---	---	---	15.4	3.2	---	16.3	14.4	---	3.2	11.5
	n	---	---	---	---	---	2	1	---	1	1	---	1	6
Tolueno	CPPT- mg/m³	2.3	2.6	2.0	4.7	3.5	11.5	13.9	32.7	21.1	29.3	39.1	158.5	28.3
	n	1	1	1	1	3	18	3	2	2	7	12	3	54
Xileno	CPPT- mg/m³	2.6	2.9	5.1	3.7	10.5	8.8	9.6	15.4	10.0	27.9	41.2	27.1	19.5
	n	1	1	1	1	3	18	3	2	2	7	12	3	54

Tabla III. Características hematológicas generales de la población estudiada

	Trabajadores con DPA-BTX Baja (<1g)‡ n= 30	Trabajadores con DPA-BTX Alta (≥1g)‡ n= 24	<i>p</i>
CMHC* (gHb/dL de eritrocitos)	33.1±1.3	32.7±1.5	0.38
Hipocromia (CMHC ≤31.5)	13.8%	13.6%	0.98
VCM† (fL por eritrocito)	90.7±4.5	90.8±4.4	0.91
Macrocitosis (≥95 fL)	20.7%	13.6%	0.71
Leucocitos/mm ³ sangre	6,961±1,297	6,256±1,379	0.06
Leucopenia (≤4,500 leucocitos/mm ³)	3.3%	8.3%	0.57
Linfopenia (<1,500 linfocitos/mm ³)	10.3%	13.6%	0.71
Plaquetas/mm ³ sangre	230,551	243,681	0.39
Plaquetopenia (<149,000 plaquetas/mm ³)	3.4%	0.0%	0.37

*CMHC: Concentración media de hemoglobina corpuscular; †VCM: Volumen corpuscular medio;
‡Estimador de dosis de BTX en mg/kg de peso por jornada de trabajo × meses laborados en la empresa

Tabla IV. Producción de IL-10, TNF- α , IL-12 y las tres citocinas en su conjunto por CMP ante estímulo con LPS por grupos de trabajadores según dosis de exposición a mezcla de BTX

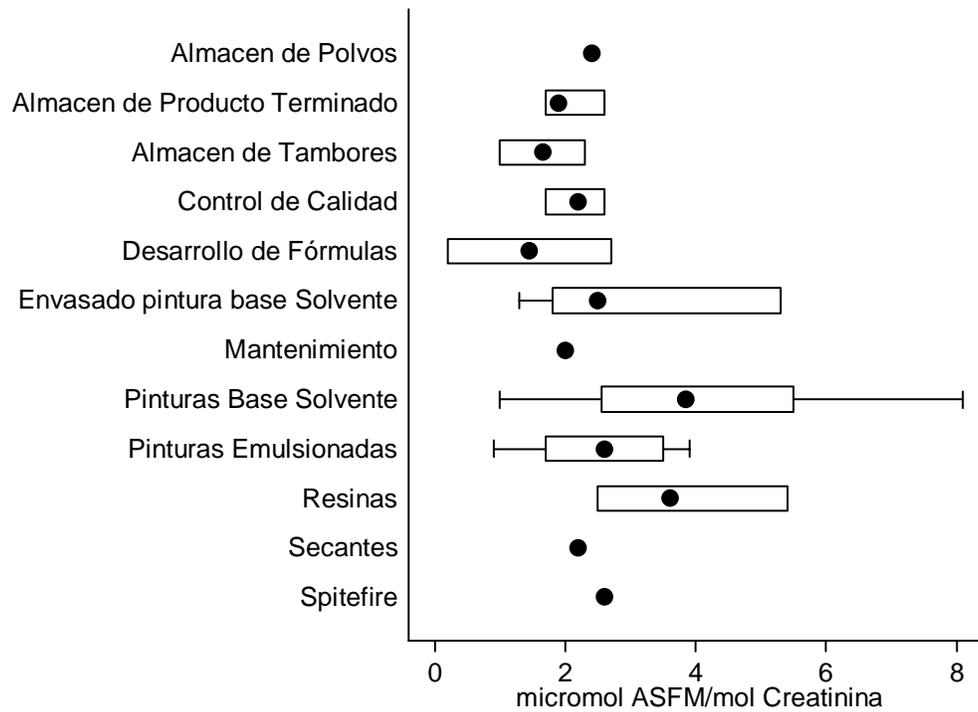
CITOCINAS	Trabajadores con DPA-BTX Baja (<1g) <i>promedio de pg/mL</i>	Trabajadores con DPA-BTX Alta (\geq1g) <i>promedio de pg/mL</i>	<i>p</i>*
Interleucina-10	1,273.9	803.2	0.08
TNF-α	1,843.9	725.2	0.01
Interleucina-12	1,586.1	848.7	0.07
Producción de las tres citocinas	4,703.6	2,377.1	0.01

*t de Student

Tabla V. Coeficientes de regresión de modelos de regresión lineal múltiple de cada una de las tres citocinas estudiadas y en su conjunto

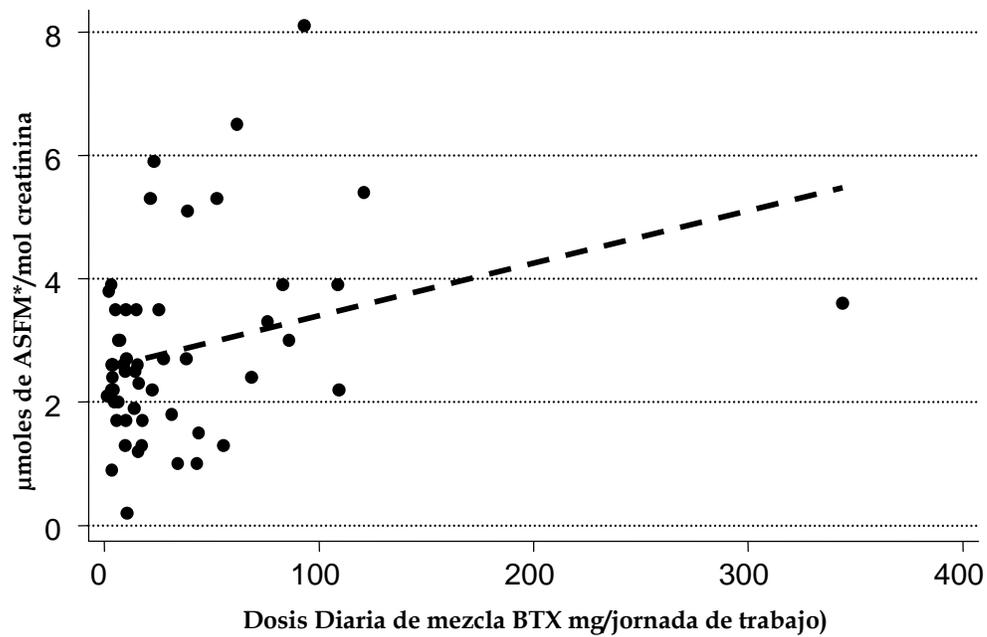
	IL-10		TNF- α		IL-12		Las tres citocinas	
	β	p	β	p	β	p	β	p
DPA-BTX Alta ($\geq 1g$)	-520.3	0.13	-1,196.0	0.01	-834.3	0.09	-2,550.6	0.02
Consumo de alcohol+	-483.2	0.29	-751.8	0.24	-1,622.6	0.02	-2,857.7	0.06
Tabaquismo+	-123.2	0.73	-131.4	0.79	433.4	0.41	178.8	0.88
IMC	-1.58	0.97	-68.6	0.34	76.81	0.30	6.59	0.96

Fig. 1. Eliminación de ácido S-fenilmercaptúrico (ASFM) por orina de los trabajadores de las diferentes áreas de trabajo*



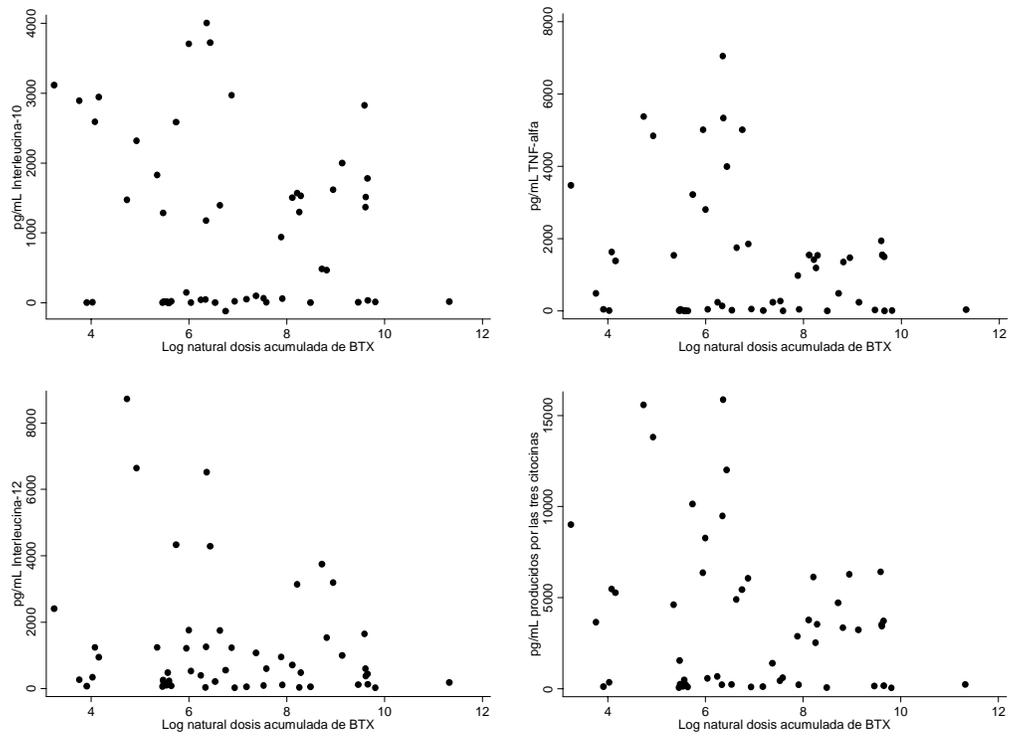
*El promedio de 1.7 μmol ASFM/mol creatinina se ha relacionado con posible exposición ocupacional a benceno; 22 μmol de ASFM/mol creatinina sería equiparable a exposición de 1ppm de benceno

Fig. 2. Correlación simple entre ácido *S*-fenilmercaptúrico determinado en orina por prueba de ELISA y los resultados del estimador de dosis potencial diaria de mezcla de BTX en mg/jornada laborada por ruta inhalatoria



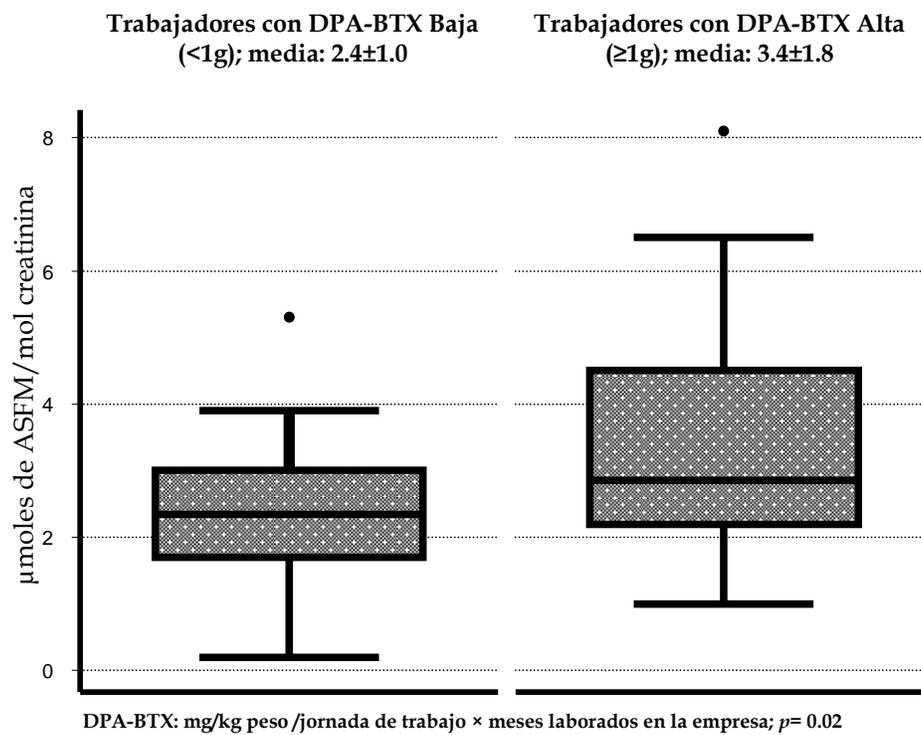
$p=0.29$; *ASF: ácido *S*-fenilmercaptúrico

Fig. 3. Correlación simple de la producción de IL-10, TNF- α , IL-12 y de las tres citocinas (diferencial pre y postestímulo con LPS) y el estimador de exposición a BTX.*



*Ninguna de las correlaciones fue estadísticamente significativa; $n = 54$, p : N.S.

Fig. 4. Eliminación de ácido S-fenilmercaptúrico (ASFM) por orina de acuerdo a grupos de DPA-BTX



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Toxicological review of benzene (Non-cancer effects); US Environmental Protection Agency, Washington DC; October 2002
2. Collins JJ, Ireland BK, Easterday PA, Nair R, Braun J. Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection. *JOEM*, 1997;(39)3:232-237
3. Chakroun R et al. Benzene exposure Monitoring of Tunisian workers. *JOEM* 2002; (44)12:1173-1178
4. Occupational Safety & Health Administration (OSHA) Substance safety data sheet, Benzene - 1910.1028 App A
5. Yin SN, Li Q, Liu Y, Tian F, Du C, Jin C. Occupational exposure to benzene in China. *Br J Ind Med*, 1987;44:192-195
6. Qu Q et al. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Am J Ind Med*, 2002;42:275-285
7. Bogadi-Sâre A, Zavalić M, Trošić I, Turk R, Kontošić I, Jelčić I. Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. *Int Arch Occup Environ Health*, 2000;73:397-400
8. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX): US Department of Health and Human Services; Public Health Service; Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); Mayo 2004
9. Mendoza-Cantú A et al. Occupational toluene exposure induces cytochrome P450 2E1 mRNA expression in peripheral lymphocytes. *Environ Health Perspect*, 2006;114(4):494-499
10. Korsak Z, Sokal JA, Górný R. Toxic effects of combined exposures to toluene and *m*-xylene in animals. III. Subchronic inhalation study. *Pol J Occup Med Environ Health*, 1992;5(1):27-33
11. Mixed exposures research agenda. A report by the NORA mixed exposure team. Department of Health and Human Services. NIOSH; Cincinnati, OH, USA; December 2004
12. Rhodes AG, LeMasters GK, Lockey JE, Smith JW, Yiin JH, Egeghy P, Gibson R. The effects of jet fuel on immune cells of fuel system maintenance workers. *J Occup Environ Med*. 2003 Jan;45(1):79-86.

13. Tanigawa T, Araki S, Nakata A, Yokoyama K. Decreases of natural killer cells and T-lymphocyte subpopulations and increase of B lymphocytes following a 5-day occupational exposure to mixed organic solvents. *Arch Environ Health* 2001;56(51):443-448
14. Hernández-Urzúa MA, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001;12:272-280
15. Malefyt RW. IL-10. Department of Molecular Biology, DNAX Research Institute; Palo Alto CA; USA; DOI: 16/1006/rwcy.2000.03.005
16. Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF- α ; Cytokine Research Laboratory, Department of Bioimmunotherapy, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA and Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK. DOI: 10.1006/rwcy.2000.05001.
17. Esche C, Shurin MR, Lotze MT. IL-12. Biological Therapeutics Program, University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA, USA; DOI: 10.1006/rwcy.2000.03006.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad
19. Vélez-Zamora NM. Tesis: Estimación de la exposición potencial por inhalación de vapores de disolventes en trabajadores de una fábrica de pinturas. Gobierno del Estado de México; México, Enero, 2008
20. Layton DW. Metabolically consistent breathing rates for use in dose assessments. *Health Phys.* 1993;64(1):23-26
21. Exposure Factors Handbook; Vol. I; General Factors, chapter V-Inhalation; EPA, USA; pp:5-7
22. McKenzie SB. Hematología Clínica. Editorial El Manual Moderno, México. 2ª Edición, 2000
23. Aston JP, Ball RL, Pople JE, Jones K, Cocker J. Development and validation of competitive immunoassay for urinary S-phenylmercapturic acid and its application in benzene biological monitoring. *Biomarkers*, 2002;7(2):103-112
24. Szklo M, Nieto J. Quality Assurance and Control, en: *Epidemiology. Beyond the basics*. Jones and Bartlett Publishers, USA, 2004; Chapter 8 pp:371
25. Power Analysis and Simple Size: <http://www.ncss.com/pass.html/>

26. Ley General de Salud, México. Última Reforma. Diario Oficial de la Federación; 19 Jun 2007; Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud.
27. Lolas F, Quezada A, Rodríguez E. Investigación en Salud. Bioética y Salud Pública, en: Dimensión Ética, CIEB, Universidad de Chile, 1ª edición, 2006; ISBN: 956-19-0501-9; Cap. VII.; pp:113
28. Doherty TM, Ardite M. Innate immunity, Toll-Like receptors and host response to infection. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:643-644
29. Adeream A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406(6797):782-787
30. Yanagawa Y, Onoé K. Enhanced IL-10 production by TLR-4 and TLR2-Primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* 2007;178:6173-6180
31. Pecheco KA, Sterritt T. The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF- β and IL-1 β . *Clin Exp Immunol* 2001;126:374-383
32. Drug discovery tools for immunotoxicology research. BD Biosciences Clontech Pharmingen BD
33. Guidance for Industry. Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); October 2002
34. Kyriakopolou M et al. The importance of fever as a predictive symptom for the potency of host's monocytes to release pro- and anti-inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 2008;2008:450196
35. Lauw FN, Hove TT, Dekkers PE, Jonge ED, Deventer SJH, Poll TV. Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin. *Infect Immun* 2000;68(3):1014-1018
36. Landrigan PJ. Benzene and blood: One hundred years of evidence. *Am J Ind Med* 1996;29:225-226
37. Cody RP, Strawderman WW, Kipen HM. Job specific trends during the first year of employment among a cohort of benzene-exposed rubber workers. *JOM* 1993;35(8):776-782
38. Toxicological profile for toluene. US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); September 2000

39. Toxicological profile for xylene. US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); September 2005
40. Haro-García LC, González-Bonilla CR, Chacón-Salinas R, Pérez-Lucio C, Juárez-Pérez CA, Borja-Aburto VH. Manifestaciones hemato/inmunológicas asociadas a exposición ocupacional a mezcla de BTX (benceno-tolueno-xileno). Rev Med IMSS (En prensa), 2008
41. Hoffbrand V, Provan D. ABC of clinical haematology: Macrocytosis anaemias. BMJ 1997;314:430-437
42. Galloway M, Hamilton M. Macrocytosis: pitfalls in testing and summary of guidance BMJ 2007;335:884-886
43. Beving H, Tornling G, Olsson P. Increase erythrocyte volume in car repair painters and car mechanic. Br J Ind Med 1991;48:499-501
44. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. Am J Clin Nutr 2007;85:193-200
45. Guidelines for Exposure Assessment. Risk Assessment Forum. US Environmental Protection Agency (EPA); Washington DC; May, 1992
46. Crebelli R et al. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. Occup Environ Med. 2001 Mar;58(3):165-71.
47. Chakroun R, Kaabachi N, Hedhili A, Feki M, Nouaigui H, Ben Laiba M, Mebazaa A. Benzene exposure monitoring of Tunisian workers. J Occup Environ Med. 2002 Dec;44(12):1173-8.
48. Vermeulen R, Li G, Lan Q, Dosemeci M, Rappaport SM, Bohong X, Smith MT, Zhang L, Hayes RB, Linet M, Mu R, Wang L, Xu J, Yin S, Rothman N. Detailed exposure assessment for a molecular epidemiology study of benzene in two shoe factories in China. Ann Occup Hyg. 2004 Mar;48(2):105-16.
49. Glass DC, Spurgeon A, Calvert IA, Clark JL, Harrington JM. Retrospective assessment of solvent exposure in paint manufacturing. Occup Environment Med 1994;51:617-625

50. Luster MI, Rosenthal GJ. Chemical agents and the immune response. *Environ Health Perspect*, 1993;100:219-236
51. Environmental Assault on Immunity. *Environews Focus*. April, 2008
52. Lustr MI, Wierda D, Rosenthal GJ. Environmentally related disorders of the hematologic and immune systems. *Med Clin North Am* 1990;74(2):425-440
53. Molls RR, Ahluwalia N, Mastro AM, Smiciklass-Wright H, Handte GC. Nutritional status predicts primary subclasses of T cells and the lymphocyte proliferation response in healthy older women. *J Nutr* 2005;135:2644-2650
54. Immunohematological reference values for healthy adults in Burkina Faso. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(6):782-784
55. Kalra R, Singh PS, Pena-Philippides JC, Langley RJ, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML. Immunossupresive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004;11(3):563-568
56. Hogg N. Nicotine has suppressive effects on dendritic cell function. *Immunology*, 2003;109:329-330
57. Dowling O, Rochelson B, Way K, Al-Abed Y, Metz CN. Nicotine inhibits cytokine production by placenta cells via NF κ B: Potential role in pregnancy-induced hypertension. *Mol Med* 2007;13(11-12):576-583
58. Laan M, Bozinovski S, Anderson GP. Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 2004;173:4164-4170
59. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit care Med*, 2004;170:492-498
60. Karimi K et al. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respiratory Research*, 2006;7:66
61. Chen JD, Wang JD, Jang JP, Chen YY. Exposure to mixtures of solvents among paint workers and biochemical alterations of liver function. *Brit J Ind Med*, 1991;48:696-701
62. Lorgeril M, Salen P. Is alcohol anti-inflammatory in the context of coronary heart disease? *Heart*, 2004;90:355-357
63. Jerrels TR, Marrieta CA, Eckardt MJ, Majchrowicz E, Wiight FF. Effects of ethanol on parameters of immunocomptenecy in rats. *J Leukoc Biol*, 1986;39:499-510

64. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*, 1999;34(6):830-841
65. Oak S, Mandrekar P, Catalano D, Kodys K, Szabo G. TLR2 and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. *J Immunol*, 2006;176:7628-7635
66. O'rourke RW et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol*, 2006;146(1):39-46
67. Manco M et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women
68. Creely SJ. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007;292:E740-E747
69. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*, 2004;15:2792-2800
70. Zelig HI. Toxic effects of chemical mixtures. *Arch Environ Health*, 2003;58(11):23-29
71. Robinson SN, Shah R, Wong BA, Wong VA, Farris GM. Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 1997;119:227-237
72. Farris GM, Robinson SN, Wong BA, Wong VA, Hahn WP, Shah R. Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. *Toxicology*, 1997;118:137-148
73. Qing L et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*, 2004;306:1774-1776
74. Alexopoulos EC, Chatzis C, Linos A. An analysis of factors that influence personal exposure to toluene and xylene in residents of Athens, Greece. *BMC Public Health* 2006;6:50
75. Sullivan KE et al. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000;7(6):920-924
76. Xing T, Li L, Cao H, Huang J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol*, 2006;147:184-188

77. Khuder SA, Youngdale MC, Bisesir MS, Schaub EA. Assessment of complete count variations among workers exposed to low levels of benzene. *J Occup Environ Med*, 1999;41(9):821-826
78. Haider DG et al. C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*, 2006;146:533-539
79. García-Moll X. Marcadores de inflamación y de antiinflamación en el síndrome coronario agudo. *Rev Esp cardiol*, 2005;58(6):615-617
80. Kum C, Kiral F, Sekkin S, Seyrek K, Boyacioglu M. *Exp Anim*, 2007;56(1):35-42
81. Kim BH, Shin HM, Jung SH, Yoon YG, Min KR, Kim Y. Anti-inflammatory benzene diamine compound inhibited Toll-Like Receptor 4—mediated inducible nitric oxide synthase expression and Nuclear Factor-KappaB activation. *Biol Pharm Bull*, 2005;28(5):908-911
82. Lan Q et al. Polymorphisms in cytokine and cellular adhesion molecule genes and susceptibility to hematotoxicity among workers exposed to benzene. *Cancer Res* 2005;65(20):9574-9581
83. Rojas-Espinoza O, Arce-Paredes P. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. Tercera parte. *Bioquímica*, 2004;29(2):55-67
84. Rappaport SM. Assessment of long-term exposures to toxic substances in air. *Ann Occup Hyg*, 1991;35(1):61-121
85. Foster JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Path*, 2001;82:171-192