

2 ej' 20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"BUSQUEDA DE FACTORES QUIMIOTACTICOS
PARA MACROFAGOS ALVEOLARES EN SECRECION
PULMONAR DE RATAS INSTILADAS CON ASBESTO
CRISOTILO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
SILVIA ARMENTA CARRILLO

México, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE:

	Página
I-INTRODUCCION	
I.a) El problema de la contaminación ambiental	8
I.b) Neumoconiosis	10
I.c) Asbestos (Generalidades)	12
I.d) Comportamiento de las partículas en el pulmón (Depósito, Remoción y Retención)	13
I.e) Enfermedades producidas por asbestos:	
- Asbestosis	15
- Mesotelioma maligno	16
- Carcinoma Broncogénico	16
- Lesiones Pleurales	17
I.f) Participación del macrófago alveolar en la - patogénesis de la Asbestosis:	
- Interacción con el sistema del complemento	18
- Producción de factores quimiotácticos	19
I.g) Importancia de los estudios experimentales- para la comprensión de los fenómenos implicados - en el desarrollo de enfermedades pulmonares produ- cidas por la inhalación de partículas.	19
II - MATERIALES Y METODOS	
- Diagrama del Método	29
II.a) Exposición	30
II.b) Estudios Morfológicos y Microanálisis	32
II.c) Lavado Bronquialveolar	34

	Página
II.d) Fraccionamiento del lavado bronquioalveolar	35
II.e) Ensayo de Quimiotaxis	35
II.f) Cuantificación de Albúmina y C3 por - Immunodifusión Radial	37
II.g) Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS	38
III - RESULTADOS	
III.a) Estudios morfológicos y microanálisis de rayos X	40
III.b) Lavado Bronquioalveolar	40
III.c) Fraccionamiento del lavado bronquioalveolar	50
III.d) Ensayo de Quimiotaxis	50
III.e) Cuantificación de Albúmina y C3 por - Immunodifusión Radial	57
III.f) Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS	58
IV - DISCUSION	65
V - CONCLUSIONES	80
VI - RESUMEN	82
VII - APENDICES	84
VIII -BIBLIOGRAFIA	88

I - INTRODUCCION

I- INTRODUCCION

I.a) El problema de la contaminación ambiental

Si bien siempre ha existido el problema de la contaminación atmosférica de origen natural en la República Mexicana, por la actividad volcánica, eólica y biológica, la industrialización del país, aunada con el uso extensivo del petróleo y sus derivados, dió lugar a que la contaminación atmosférica, particularmente en ciertas localidades, adquiriera niveles cuyos efectos comienzan a tener consecuencias altamente riesgosas para la salud (67).

Este problema de contaminación en el Valle de México tiene antecedentes precortesianos con las tolvaneras, que como fenómeno natural siempre se ha presentado en él. Sin embargo, el gran crecimiento demográfico y el desarrollo industrial y tecnológico que ha tenido lugar desde la década de los cincuenta, así como el uso más generalizado del automóvil, le ha dado un nuevo carácter.

Es evidente, que el deterioro de la atmósfera por la emisión de gases, humos y polvos, ha rebasado su capacidad de autodepuración, deterioro que se manifiesta en perjuicio de la salud.

Esta situación que afecta a diversas ciudades del país, se agudiza en el Valle de México. Sus condiciones topográficas rodeado de altas montañas, su clima y su altitud, favorecen la interacción de los contaminantes con los seres vivos, al producir inversiones térmicas y cambios en la mecánica ventilatoria de sus habitantes (57 , 67).

Existe un vasto y complejo número de contaminantes en el aire urbano, los más frecuentes son el monóxido de carbono; óxidos de azufre y nitrógeno, hidrocarburos policíclicos, metales pesados, partículas orgánicas e inorgánicas, etc. Todos ellos son capaces de producir o agravar diversas enfermedades en distintos órganos, como son los padecimientos crónicos del corazón y de los pulmones. Impiden el movimiento de aire dentro y fuera de los pulmones, el transporte de oxígeno e irritan vías aéreas, ojos y piel, causando alergias, conjuntivitis, dermatosis, etc (57 , 81).

La exposición humana se ve influenciada tanto por condiciones meteorológicas, topográficas y ocupacionales, aunque dado el empeoramiento que ha tenido la contaminación atmosférica, es de esperarse que en ambientes no ocupacionales se produzcan alteraciones. Estas últimas, por ser en condiciones menos drásticas, se manifiestan menos notablemente o bien, no se les identifica por no asociarlos con contaminantes ambientales naturales o industriales. Cuando esta exposición ocurre exclusivamente en el ambiente de trabajo, se habla de una exposición de tipo laboral.

Por lo mismo, el estudio de los efectos de la contaminación sólo se había enfocado a gases y partículas en ambientes ocupacionales, a pesar de que la aparición de lesiones en este tipo de exposiciones tarda varios años, y depende de la variabilidad en la respuesta de cada individuo. Fué sólo hasta que ocurrieron fenómenos naturales como erupciones volcánicas o accidentes de gran magnitud (54, 89), que se empezó a despertar el interés por el estudio más detallado del efecto de las partículas. Las consecuencias de estas exposiciones (tanto ambientales como laborales) se han abordado de diversas formas, todas ellas con el interés de conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de las patologías asociadas, tanto con contaminantes específicos causantes de ellas, o con agentes que todavía no son reconocidos como tales.

Dentro de estos estudios encontramos en primer término la búsqueda de datos epidemiológicos y las observaciones clínicas, cuyo conocimiento concerniente a enfermedades relacionadas con diversos polvos permanece incompleto, debido al periodo de latencia tan largo que se requiere para que comience a manifestarse clínicamente la enfermedad.

Subsecuentes a estos datos se encuentran los estudios in vitro, los que constituyen un primer intento para confirmar o predecir la toxicidad de polvos minerales en humanos, al permitir conocer los eventos celulares o moleculares inducidos por los mismos.

Asimismo, como estudio intermedio entre los métodos in vitro e in vivo, el análisis en fluido pulmonar permite hacer un seguimiento de los eventos que preceden la caracterización de las patologías.

Adicionalmente, con el recurso de los modelos animales, es posible demostrar la relación polvo-enfermedad observada en el hombre, permitiendo explorar dosis, patogenicidad y conocer parámetros de los polvos en relación a su fibrogenicidad y carcinogenicidad. También es posible usarlos como sistemas de prueba de nuevos materiales (2).

Como ya se ha mencionado, la mayor parte de la información que se tiene acerca del desarrollo de ciertas patologías y cuya relación con polvos contaminantes está ya establecida, proviene primordialmente de casos de exposición ocupacional.

Dentro de estas alteraciones se encuentran las entidades patológicas llamadas Neumoconiosis. Dichas entidades han sido ampliamente estudiadas, al hacer uso de modelos experimentales de exposición como los de Silicosis y Asbestosis, que han sido de gran valor para la comprensión del proceso patológico que se lleva a cabo.

1.b) Neumoconiosis

Al ser el aparato respiratorio la vía de entrada del aire ambiental, es el que tiene más probabilidad de interactuar con gases y partículas provenientes de la atmósfera, por lo que las enfermedades pulmonares pueden resultar de la inhalación de polvos, gases, humos o agentes infecciosos que están en el lugar de trabajo o en el ambiente natural.

En el caso específico de que sean partículas o polvos minerales y orgánicos, las patologías que generan son las Neumoconiosis.

Zenker fue el primero en describirlas, y se refiere al conjunto de alteraciones fibrosas crónicas pulmonares, producidas por la inhalación y la fijación en el pulmón de partículas y que pueden presentar diferentes formas, de acuerdo al agente extraño que las provoquen (25 , 46).

No todos los polvos son patógenos, ya que algunos son inertes mientras que otros producen reacciones inflamatorias y son fibrogénicos. Los polvos fibrogénicos causan una reacción esclerótica progresiva del tejido conjuntivo pulmonar, destruyendo gran parte del parénquima respiratorio y como consecuencia la inducción de insuficiencia pulmonar así como predisposición a otras afecciones como la tuberculosis (90). El ser humano las ha padecido desde hace varios siglos. Con el advenimiento de la Revolución Industrial en Europa en el siglo XVIII, se incrementó la producción de polvos con porcentajes importantes de partículas respirables de menos de 5 μ m de diámetro.

En la República Mexicana entre 1975 y 1977 las Neumoconiosis ocupaban el primer lugar dentro de las enfermedades ocupacionales (46), lo que demuestra nuevamente la relevancia que tiene su estudio en nuestro medio.

Se han hecho muchas clasificaciones de enfermedades respiratorias ocupacionales. Una recopilación de ellas se presenta en el Cuadro 1, donde se menciona la partícula patógena, el tipo de exposición más común y las enfermedades que producen (62):

CUADRO 1

<u>Tipo de partícula</u>	<u>Patología producida</u>	<u>Exposición</u>
	Fibrosis y/o Cáncer	
SILICE (principalmente la forma cristalina como el cuarzo, aunque el silice amorfo ha de mostrado incrementar la incidencia de enfermedades pulmonares.	Silicosis	Mineros y Alfareros
ASBESTO	Asbestosis	Mineros, personal en la industria del aislamiento y de la construcción. Algunos casos en poblaciones abiertas.
CARBON	Antracosis	Mineros
SILICATOS:		
Fibra de vidrio	Silicatosis	Industria
Talco		Mineros
Tierra Diatomácea		Industria y actividades como la alfarería.
(Ceniza Volcánica)		Feldespatos
Mica		Exposiciones naturales como tobaneras o erupciones volcánicas.
Berilio	Beriliosis	Exposiciones naturales
Aluminio	Aluminosis	Industria
Hierro	Siderosis	Industria Soldadores
Titanio	Pulmón de Titanio	Industria
Estaño	Estanosis	Industria
Bario	Baritosis	Minería

I.c) Asbestos (Generalidades)

Asbesto es el término genérico que se aplica a varios silicatos minerales hidratados ($3MgO \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$), que se encuentran en la naturaleza y cuya característica común es su resistencia a las altas temperaturas.

A pesar de que su descubrimiento fue desde 1877, sus efectos adversos sobre la salud se observan hasta comienzos del siglo XX.

La asociación entre la exposición a los asbestos y el desarrollo de varias condiciones patológicas, empezó a cobrar importancia a partir del crecimiento desmesurado de la industria del asbesto (6, 66, 80).

Aunque la mayor parte de estas patologías se han derivado de casos donde la exposición ha sido de tipo ocupacional, también se han descrito casos de exposiciones ambientales no ocupacionales (6).

Independientemente de lo anterior, las manifestaciones más comunes de la exposición a los asbestos, la constituyen alteraciones malignas y no malignas del pulmón y otros órganos, entre las que se encuentran fibrosis intersticial pulmonar, cuerpos de asbesto en pulmón, hialinización de pleura, placas pleurales calcificadas, carcinoma broncogénico asociado con asbestosis, mesotelioma maligno de pleura y peritoneo y aumento en la incidencia de neoplasias en aparato gastrointestinal y genital (22, 32).

Otro tipo de neoplasias que recientemente se han asociado también con asbestos son las de tipo linfóide como la leucemia linfocítica crónica, mieloma y linfoma histiocítico (37). Así se ha demostrado que puede provocar anomalías sistémicas a nivel celular y humoral. Dichas alteraciones se han observado en individuos con asbestosis y van desde un desbalance entre células supresoras y de ayuda por el incremento en número de estas últimas, hasta aumentos en la expresión de receptores para Interleucina-2 y Ia en linfocitos. Además se encuentran defectos en la función de las células eliminadoras, aumento en la frecuencia de anticuerpos no específicos en suero y de complejos inmunes circulantes y linfocitotóxicos, y naturalmente el desarrollo de neoplasias de células B (28, 39, 51).

Existen varios tipos de asbesto de acuerdo a sus características mineralógicas entre los cuales se encuentran el crisotilo (asbesto blanco), la crocidolita (asbesto azul), la amosita (asbesto pardo), la antofilita, la actinolita y la tremolita.

Todos tienen importancia patogénica, y el tipo de asbesto es un factor importante para considerar el riesgo de enfermedad (77).

Así, todos los tipos comerciales de asbesto pueden provocar fibrosis pulmonar, pero no todos los tipos de asbesto son igualmente fibrogénicos (61). La crocidolita por ejemplo, puede ser más fibrogénica y más generadora de mesoteliomas pleurales en humanos que el crisotilo. Sin embargo, el crisotilo es el que produce mayor citotoxicidad además de ser el más ampliamente usado en el mundo, siendo el causante de más del 90% de las exposiciones industriales en los Estados Unidos y en Europa. El crisotilo se presenta en el medio como fibras que tienen una forma cilíndrica, consistiendo de un núcleo de silice y una cubierta de $Mg(OH)_2$. Son generalmente largas y muy flexibles (6, 71).

I.d) Comportamiento de las partículas en el pulmón. (Depósito, Remoción y Retención)

DEPOSITO - Cuando las fibras son inhaladas, su depósito en el pulmón, como cualquier partícula, depende de tres factores: el comportamiento aerodinámico de las partículas, las dimensiones del tracto respiratorio y el patrón de respiración que acarrea las partículas.

Comportamiento Aerodinámico: Sigue las leyes físicas que gobiernan su movimiento, hasta que se depositan en la superficie del tracto respiratorio, las cuales incluyen las fuerzas inerciales, sedimentación, movimiento browniano e intercepción.

Dicho comportamiento es función primordialmente del diámetro, tamaño, forma y densidad de la partícula. Estudiando el depósito de partículas en animales experimentales, se ha observado que en el caso de las fibras, las de mayor diámetro ($>$ de $10 \mu m$) tienden a depositarse preferencialmente en el tracto respiratorio superior, mientras que las pequeñas ($<$ de $5 \mu m$), son acarreadas al interior del parénquima pulmonar (6, 20).

Dimensiones del tracto respiratorio: El volumen pulmonar influye no sólo en la distribución, sino posiblemente en el patrón de retención, particularmente si la respiración se lleva a cabo a menos de la capacidad funcional normal (como sucede en fumadores o enfermos pulmonares). Las partículas tienden a depositarse en las vías aéreas menores de 1 mm de diámetro, pero en casos de broncoconstricción u obstrucción de las mismas, las partículas se depositan en trectos superiores, y por lo tanto disminuyen o impiden el depósito en los alveolos, por lo cual tienden a depositarse centralmente, sin involucrar el parénquima pulmonar (10).

Patrón Respiratorio: El patrón de depósito puede ser profundamente modificado por el patrón respiratorio. La

respiración lenta y profunda, favorece una mayor distribución del aire inspirado, y por consecuencia, una mayor distribución de las partículas inhaladas.

REMOCION - La remoción de partículas se refiere a los procesos dinámicos que expelen físicamente las partículas previamente depositadas en el tracto respiratorio. Las partículas que son altamente solubles, son absorbidas en la sangre del tracto respiratorio alto. Cuando no son solubles y se depositan en las zonas no ciliadas del tracto respiratorio, las partículas pueden seguir dos caminos; ser transportadas hacia las regiones ciliadas por los macrófagos alveolares o cuando no pueden depurarse de esta manera, pueden entrar a la pared alveolar y acumularse en el tejido conjuntivo, o viajar por vía linfática hacia los nódulos linfáticos. El material que es atrapado o llevado por movimiento ciliar a la nariz y laringe, se mezcla con secreción salival y se deglute o expectora. El tiempo de depuración es un factor importante en la efectividad de la partícula, ya que entre más tiempo permanezcan las partículas, más posibilidad tienen de causar alteraciones. Esto sucede en los compartimentos no ciliados, en los cuales, las partículas tienen un mayor tiempo de residencia.

Otro mecanismo de remoción importante, es el que llevan a cabo los macrófagos alveolares, los que al fagocitar las partículas disminuyen la posibilidad de que éstas causen daño.

La depuración de las partículas inhaladas por estos mecanismos se cree tiene una efectividad de más del 98% para la mayoría de las partículas depositadas, pero siempre queda un porcentaje remanente (9, 11).

RETENCION - La retención es el producto del equilibrio entre la tasa de depósito y remoción, de tal suerte que las propiedades de la partícula y el mantenimiento de este equilibrio, está posiblemente relacionado con su potencial de respuesta patológica.

La incidencia de las enfermedades producidas por asbesto depende de numerosos factores, entre los que ya se han mencionado el tipo de mineral, la dimensiones de las fibras, la concentración, la duración de exposición, la susceptibilidad individual, etc (77).

En el caso del asbesto crisotilo, el depósito de las fibras en animales experimentales, ha mostrado ser primordialmente influenciado por el diámetro de las mismas, más que por su longitud y ello es determinante de su potencial patogénico.

Como un índice de retención se ha considerado la formación de cuerpos ferruginosos (fibras de asbesto cubiertas), no obstante que éstos se pueden encontrar en ausencia de enfermedad parenquimatosa seria.

Al observar con microscopio electrónico de rayos X muestras pulmonares de trabajadores expuestos, el microanálisis con rayos X evidencia que la mayor parte de las fibras (en el orden del 75%) se encuentran sin cubierta, es decir, no forman el núcleo de un cuerpo de asbesto, lo que sugiere una alta penetración y tasa de retención de partículas.

Las fibras cubiertas se forman como resultado de un proceso intracelular, cuando son englobadas por los macrófagos. Si las fibras son muy largas, varias células se adhieren, incorporándolas dentro de las vacuolas intracitoplásmicas. El primer material que cubre a la fibra, aparece como alguna forma de mucopolisacárido ácido. En el citoplasma del macrófago el hierro se acumula en forma de hemosiderina. Las micelas de hierro, posiblemente derivadas del rompimiento de la hemoglobina empiezan subsecuentemente a incorporarse dentro de los fagosomas y tienden a concentrarse alrededor de la fibra.

Este proceso es progresivo, con un incremento de cobertura respecto al tiempo, con un requerimiento de meses o años para su formación después de la exposición. Hay alguna evidencia de que el recubrimiento de una fibra la convierte en no fibrogénica. El que algunas fibras se cubran y otras no, parece ser función de el tamaño, ya que un típico cuerpo de asbesto se desarrolla solamente en partículas grandes (mayores de 5 μm) (6).

Es importante aclarar que el proceso de recubrimiento no es una respuesta específica para fibras de asbesto, ya que otra gran variedad de fibras como las de vidrio y algodón, talco, grafito, etc, pueden sufrir el mismo proceso.

I.e) Enfermedades producidas por asbestos

- Asbestosis

La asbestosis es la típica alteración pulmonar que se presenta en personas ocupacionalmente expuestas, y se caracteriza por una fibrosis intersticial difusa en el pulmón. Su desarrollo es lento y parece ser progresivo en la ausencia de exposición continua.

Al inicio la fibrosis se encuentra alrededor de los bronquiolos respiratorios y conductos alveolares. Con el tiempo, la lesión fibrotica progresa involucrando más unidades respiratorias (6, 22, 32, 39, 88).

La observación macroscópica de la lesión, indica que ésta se ubica preferencialmente en los lobulillos inferiores y la pleura visceral adyacente.

- Mesotelioma maligno

Los mesoteliomas malignos de pleura y cavidad peritoneal, se asocian con la exposición al asbesto, aunque en algunos casos el contacto con el mineral no ha sido determinado.

El desarrollo de estas patologías es consecuencia de una exposición pasajera o casual.

La dimensión de la fibra es un factor relevante en el desarrollo tumoral y la gran solubilidad del crisotilo hace que su desintegración gradual en el tejido, pueda influir en la incidencia poco comun de mesoteliomas tanto en cavidad pleural como peritoneal.

- Carcinoma Broncogénico

Los estudios epidemiológicos han documentado una asociación entre el carcinoma broncogénico y la exposición ocupacional al asbesto.

Existe alguna controversia en relación al tipo histológico más comun del tumor, pero entre las personas con asbestosis, el adenocarcinoma predomina. Las lesiones tienden a ocurrir con mayor frecuencia en los lóbulos inferiores, en conjunción con varios grados de fibrosis. Además se puede observar hiperplasia atípica del epitelio bronquiolar y adenocarcinomas multifocales en esos sitios.

El potencial carcinogénico de los asbestos en el tracto gastrointestinal parece ser bajo.

La función precisa que tiene el asbesto en el proceso carcinogénico aún no se ha definido a pesar de la relación que muestran los datos epidemiológicos entre la exposición al asbesto y el carcinoma broncogénico. Su modo de acción no puede ser comparable al de un carcinógeno químico clásico, ya que el asbesto no es reconocido como un mutágeno potente y además no causa aberraciones cromosómicas de manera consistente.

Por lo mismo parece lo más adecuado sugerir que los asbestos incrementan la susceptibilidad de las células epiteliales del bronquio y sus ramificaciones a la transformación por carcinógenos en el ambiente.

Por otro lado se ha hecho la observación de que la acción combinada del asbesto con el tabaquismo, parece multiplicar sus efectos.

Hay varias hipótesis que tratan de explicar este sinergismo. Una de ellas es que tanto el asbesto como el humo del cigarro, tienen

propiedades promotoras, o también el que las fibras de asbesto puedan ser fagocitadas por las células del epitelio bronquial y ser transportados intracelularmente ya sea libres en el citoplasma o en fagolisosomas. Estas fibras pueden servir como un acarreador físico de carcinógenos en el humo del cigarro a las células de la capa basal, las presuntas progenitoras de neoplasias.

Por último se ha sugerido que el macrófago alveolar al fagocitar el asbesto, posee la capacidad enzimática para convertir hidrocarburos policíclicos a metabolitos activos.

En la actualidad el mecanismo de carcinogénesis no es claro, lo que sí se sabe es que el mineral actúa de forma similar a la de un agente tumoral (22).

- Lesiones Pleurales

Las placas pleurales son lesiones hechas de tejido fibroso hialinizado, localizadas sobre la pleura parietal del diafragma, mediastino y pericardio. Estas se asocian generalmente a la exposición al asbesto y es común encontrar lesiones en la ausencia de enfermedad obvia del parénquima.

I.f) Participación del macrófago alveolar en la patogénesis de la Asbestosis

La inhalación de partículas (como asbestos) causa, como ya fue mencionado, una progresiva enfermedad fibrotica en el pulmón. Sin embargo la patogénesis de la enfermedad no ha sido totalmente dilucidada.

Se sabe que los macrófagos alveolares desempeñan un papel central en dichas enfermedades inducidas por partículas, implicándolos como mediadores significativos dado su comportamiento fagocítico, patrón de migración y potencial secretorio.

Los macrófagos tienen muchas funciones, entre las que se encuentra la fagocitosis de microbios y partículas. Secretan gran variedad de sustancias que interactúan como una cascada multienzimática con otros tipos celulares como linfocitos, fibroblastos, neutrófilos y otros macrófagos (10, 13, 14).

Bajo ciertas condiciones, son dañados como consecuencia de la ingestión de partículas y la naturaleza del daño es relevante para el desarrollo de la enfermedad pulmonar.

En respuesta a un estímulo fagocítico, los macrófagos secretan enzimas como las hidrolasas lisosomales, proteasas, antiproteasas, colagenasa, elastasa, lisosima y otros mediadores

como la fibronectina, interferón, componentes del complemento, etc (1, 8, 49, 59). Otros materiales biológicamente activos secretados por los macrófagos incluyen factores de angiogénesis, activador del plasminogeno, nucleósidos, nucleótidos cíclicos, pirógenos, factores inductores del crecimiento fibroblástico y tumoral, productos de oxigenación del ácido araquidónico (prostaglandinas), interleucina I, una serie de mitógenos para células T y B y factores quimiotácticos (33, 39, 51).

Además de la protección del huésped, los macrófagos tienen también el potencial de participar en la patogénesis de las enfermedades pulmonares, principalmente las asociadas con aberraciones de la colágena normal y el balance de elastina, cuyo resultado es el origen de desordenes enfisematosos y fibroticos.

En la asbestosis la fibrogénesis puede continuar mucho tiempo después de que se han inhalado las partículas. Asimismo un continuo flujo de nuevos macrófagos es con frecuencia una característica prominente del proceso fibrogénico.

Dicha respuesta macrofágica ha sido parcialmente estudiada en ratas expuestas al asbesto crisotilo. Por ejemplo, se sabe que las fibras son depositadas inicialmente en la bifurcación de los ductos alveolares. Estas células, las cuales han respondido a la presencia del asbesto, han fagocitado fibras y se unen estrechamente al epitelio alveolar. Algunas de estas fibras son tomadas por los neumocitos tipo I del epitelio y son translocadas al intersticio (16, 17, 19, 20).

Estas y otras fibras, activan simultáneamente un factor quimiotáctico derivado del complemento que atrae macrófagos al sitio donde se depositaron las fibras.

- Interacción con el sistema del complemento

El sistema del complemento es una secuencia de once proteínas, el cual cuando es activado se convierte en un mediador principal del daño tisular. La activación de la secuencia de proteínas puede ser iniciada por dos rutas, la clásica y la alterna. La vía alterna es la única que puede ser activada por varias sustancias como el zimosa y la endotoxina bacteriana, mientras que la ruta clásica requiere la formación del complejo Antígeno/Anticuerpo (86).

Se conoce la capacidad del asbesto crisotilo para activar el complemento del suero y producir el factor C5a (24, 34, 69, 71, 78, 79), que es un potente quimioatrayente para macrófagos pulmonares. También se sabe que las proteínas del complemento derivadas del plasma, se encuentran sobre las superficies alveolares, aunque se ha informado que varias proteínas del sistema del complemento, pueden ser sintetizadas por los macrófagos y sus células precursoras denominadas monocitos (27, 30, 33, 43, 68, 74).

Se ha mencionado a manera de hipótesis que las fibras de asbesto,

al impactarse sobre las superficies de las bifurcaciones, activan componentes del complemento en la capa alveolar subyacente para

producir el factor C5a, constituyendo así un sistema de amplificación de respuesta pulmonar, que permite la persistencia de un estado inflamatorio (82, 83).

- Producción de factores quimiotácticos

Aparte del factor quimioatrayente C5a, se ha descrito la producción de otros factores de menor peso molecular, tanto in vivo como in vitro, y que no son derivados del complemento (28, 34, 42, 50, 52, 72).

Incluso los mismos macrófagos alveolares pueden secretar agentes quimiotácticos en respuesta a varios estímulos, entre ellos la inhalación de asbestos (7, 49, 56, 65). Kagan encontró que después de exponer ratas crónicamente al asbesto, sus macrófagos alveolares en cultivo producen quimiotaxinas para macrófagos (38).

Esto sugiere que el complemento no es el único generador de quimioatrayentes que participa en la lesión pulmonar producida por polvos inorgánicos y que la acumulación pulmonar inicial de macrófagos resulta primordialmente, pero no únicamente, de la activación del sistema del complemento.

La respuesta quimiotáctica de los macrófagos pulmonares puede no ser única a los asbestos, ya que una gran variedad de partículas, como polvos de granos de cereal, zimosán y cenizas, son conocidos como factores que activan el complemento en suero, aunque unos en menor grado, como en el caso de las cenizas volcánicas (54, 60, 89).

I.g) Importancia de los estudios experimentales para la comprensión de los fenómenos implicados en el desarrollo de enfermedades pulmonares producidas por la inhalación de partículas

El desconocimiento que se tiene sobre una gran variedad de partículas, en cuanto a su potencial patogénico, realza la necesidad de diseñar modelos experimentales que permitan conocer a fondo los fenómenos implicados en el desarrollo de las enfermedades pulmonares.

Más aún, se resalta esta necesidad dadas las condiciones ambientales que se viven actualmente en la Ciudad de México y en el resto de la República, en donde se ha tenido conocimiento de casos de pacientes con patologías pulmonares, debidas a partículas por exposiciones ambientales.

Uno de estos casos se presentó en el Instituto Nacional de

Cardiología "Ignacio Chávez" (63), y se trataba de una paciente, originaria de la ciudad de Mexicali, Baja California, a quien se

le diagnosticó una enfermedad granulomatosa intersticial por cuerpo extraño. El estudio por espectrometría de rayos X del material presente en los granulomas, reveló la presencia anormal de partículas compuestas por aluminio, silicio y potasio. Al analizar la composición de las muestras colectadas en el ambiente doméstico de la paciente, se demostró una similitud en la composición.

Esta partícula, denominada polvo de Mexicali ha demostrado ser citotóxica en ensayos in vitro y ser capaz de activar in vitro complemento sérico y de secreción pulmonar por la vía alterna (30).

Por lo anterior en la actualidad resulta difícil aceptar que cualquier polvo ambiental inhalado, ya dentro del pulmón sea en verdad inerte, incluso aquellos polvos que generalmente se ha pensado no son fibrogénicos u oncogénicos.

La realización del presente trabajo, surgió por la necesidad de conocer la forma en que una determinada partícula puede interactuar con sistemas biológicos, tan complejos como lo es el pulmón, y al saber además, que el uso de un modelo experimental es el recurso más adecuado y factible para alcanzar esos objetivos.

Hasta la fecha permanecen todavía inciertos los mecanismos biológicos por los cuales el asbesto produce fibrosis, neoplasias o inflamación, ya que las interacciones entre las fibras con células y componentes del fluido pulmonar, inducen una compleja serie de eventos que son difíciles de interpretar, sin embargo varios procesos significativos ya han sido parcialmente dilucidados.

El ejemplo más claro en este aspecto, es el desarrollo de la fibrosis intersticial, en la cual se ha demostrado que los factores quimiotácticos son un punto primordial, dado que son los que desencadenan y mantienen la lesión.

Ya han sido descritos varios tipos de quimiotaxinas que difieren entre sí en diversos aspectos (Cuadro 2), incluso han sido detectados por exposición a otro tipo de polvos como el silice y también cuando solo ha habido sucesivos lavados bronquioalveolares.

Así al considerar la relevancia que tienen los factores quimiotácticos en la producción de daño tisular, tanto nuestra hipótesis de trabajo, como los objetivos centrales giran alrededor de este aspecto.

Los objetivos generales que se pretenden cumplir en este estudio son:

- Producir una respuesta celular en el pulmón en lapsos cortos

CUADRO 2

RELACION DE FACTORES QUIMIOTACTICOS ENCONTRADOS EN HUMANOS Y EN MODELOS ANIMALES

AUTOR (AÑO)	POLVO O ESTIMULO UTILIZADO	MODELO ANIMAL
1) Kasmierowski (1977)	Bacterias y/o adhesión a superficies de vidrio. Lavados bronquioalveolares sucesivos.	Primates no humanos
2) Hunninghake (1978)	Asbesto crisotilo y Staphylococcus aureus	Cuyo
3) Merrill (1980)	Zimosán o Ig	
4) Miller K. (1980)	Silice (cuarzo)	Cuyo
5) Lugano (1981)	Silice y Látex	Cuyo
6) Lugano (1982)	Silice	Cuyo
7) Hartmann D. (1983)	Asbesto crisotilo y croci dolita	Rata
8) Kaelin (1983)	Bleomicina	Hámster
9) Kagan E. (1983)	Asbesto crisotilo y croci dolita	Rata
10) Schmidt A. (1984)	Silice (cuarzo)	
11) Warheit (1985)	Asbesto crisotilo	Rata
12) Parsons (1985)	Pacientes con Síndrome de inmunodeficiencia respiratoria del adulto	

PRODUCCION		TIPO DE EXPOSICION	TIEMPO DE EXPOSICION	CELULA BLANCO	
IN VITRO	IN VIVO				
1)	X	X	Segundo lavado 4 h después del inicial	Polimorfo nucleares preferencialmente y también para células mono nucleares	
2)	X	X	Instilación Fagocitosis	In vitro: 1,2 y 18 h In vivo: 1 h	Primordialmente para neutrófilos Menos activo para monocitos
3)	X			Polimorfo nucleares	
4)	X		Inhalación	6 meses	Macrófago alveolar
5)	X	X	Contacto directo	2 horas	Polimorfonucleares
6)		X	Instilación	1,2,4,7 y 14 días	Polimorfonucleares
7)		X	Inhalación	Protocolo Kagan F.	Linfocitos (activa) Fibroblastos (incrementa la síntesis de ADN)
8)		X	Instilación	1,4,8 y 15 días	Polimorfonucleares y linfocitos
9)		X	Inhalación	6 h/día 5 días/semana por 91 días	Macrófago alveolar
10)		X	Contacto directo	24 horas	Timocitos y fibroblastos
11)		X	Inhalación	1,3 y 5 h	Macrófago alveolar
12)		X			Polimor

PESO MOLECULAR	PROPIEDADES	FUENTE DE PRODUCCION	CARACTERIZACION
1) Uno de 5 kDa y otro de 15 ka	El de 5 kDa es termolábil y su actividad no se ve afectada con antisueros C5 y C3	El de 5 kDa por el macrófago alveolar y el de 15 kDa por complemento activado	El de 15 kDa posiblemente es C5a, y el de 5 kDa se desconoce
2) < 5kDa	Su producción se inhibe con actinomicina y cicloheximida. Estable a 56°C por 45 min, pero no a 100°C por 10 min.	Macrófago alveolar	?
3) 1 kDa y 10 kDa	El de 10 kDa es sensible a tripsina y su actividad no se afecta con anti-C5	Macrófago Alveolar humano	?
4) ?	?	Posiblemente el macrófago alveolar o por polimorfonucleares	?
5) ?	?	Macrófago alveolar	?
6) ?	?	Macrófago alveolar	?
7) ?	?	Macrófago alveolar y linfocitos	Posiblemente Interleucina I y II
8) Para polimorfo nucleares uno de 1 kDa y otro de 10 KDa	?	Macrófago alveolar	?
9) Uno de 13-15 kDa, y otro de 23-26 kDa	Termolábil, no dializable, sensible a tripsina. Su actividad se abate parcialmente con actinomicina D y	Macrófago alveolar	?

posteriores a la exposición al asbesto crisotilo, con el método de instilación intratraqueal.

- Observar si dicha respuesta pulmonar está caracterizada por agrupación de macrófagos, en los sitios de depósito de las fibras de asbesto.

- Determinar si la agrupación macrofágica es un fenómeno paralelo con la elevación de factores quimiotácticos.

- Dilucidar si el complemento activado es el único generador de quimioatrayentes, o surgen otros productos de fuentes diferentes a través del tiempo.

Como objetivos particulares se establecen los siguientes:

- Separar del lavado bronquioalveolar los elementos quimiotácticos de acuerdo a su peso molecular.

- Evaluar para cada factor su peso molecular y actividad quimiotáctica para macrófagos alveolares.

- Determinar la cantidad de albúmina y C3 en las fracciones que resulten quimiotácticas, con el fin de verificar si hay trasudación de suero (por medio de la albúmina) y si existe activación de complemento en los grupos expuestos.

- Establecer un patrón electroforético de dichas fracciones quimiotácticas.

Las hipótesis de trabajo que se establecen son las siguientes:

- Los animales expuestos al asbesto presentan una respuesta pulmonar caracterizada por la acumulación de macrófagos en los sitios de depósito de las fibras.

- En animales instilados con asbesto, el acúmulo de macrófagos está mediado por la producción de factores quimiotácticos.

- La actividad quimiotáctica es debida en gran parte a la activación del complemento, sin embargo aparecen otros factores no determinados conforme aumenta el tiempo de exposición.

II- MATERIALES

II - MATERIALES

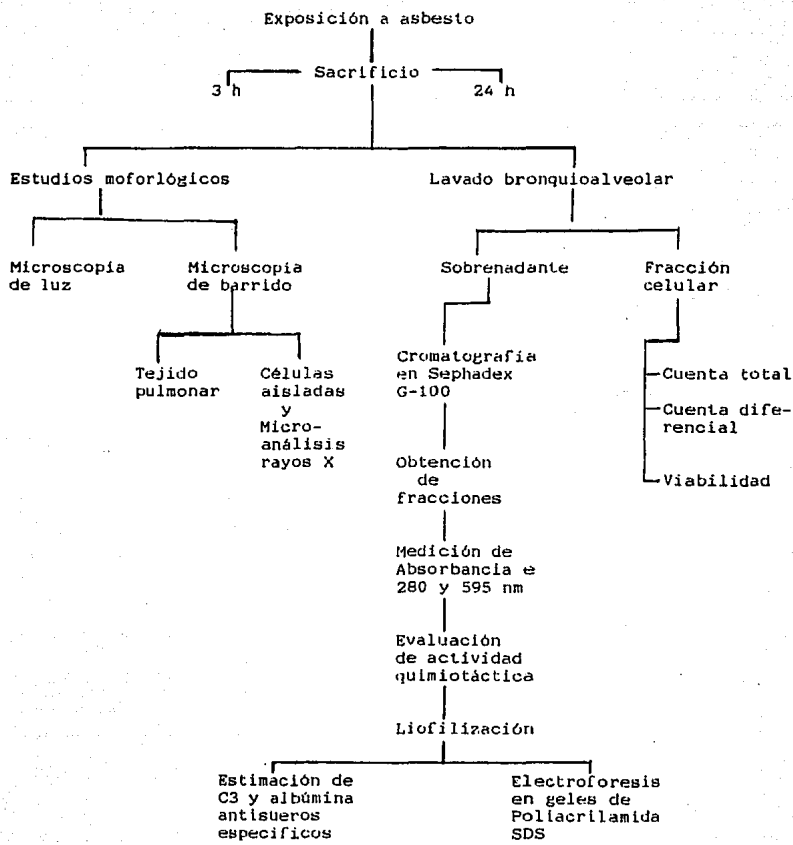
Reactivos:

- Aquacide -----	Calbiochem Behring Corporation
- Eosina-----	Chroma
- Medio RPMI-1640 -----	Gibco
- Azul de Bromofenol-----	Merck
- B-Mercaptoetanol-----	Merck
- Aduyantes completo de Freund -----	Microlab
- SAB (Sol.Amortiguadora de Barbituratos)-----	Microlab
- Azul Dextran 2000 -----	Pharmacia
- Electrophoresis Calibration Kit -----	Pharmacia
- Sephadex G-100-----	Pharmacia
- Gentamicina del medio -----	Scheramex
- Acrilamida -----	Sigma
- Agarosa -----	Sigma
- Albúmina Sérica Bovina -----	Sigma
- Azul de Coomassie G-250-----	Sigma
- Azur-----	Sigma
- Bisacrilamida -----	Sigma
- Citocromo C -----	Sigma
- HFPFS -----	Sigma
- Zimosán A -----	Sigma
- Pentobarbital Sódico Anestesia-----	Smith Kline

Equipo:

- Aparato para Electroforesis-----	Pharmacia Electrophoresis Apparatus
- Bolsas para Diálisis-----	Spectrapor Dialysis Membranes (Spectrum Medical Industries Inc)
- Colector de fracciones-----	Redirac Fraction Collector LKR 2112 (LKB Bromma)
- Densitómetro-----	Quick Scan Flur-Vis (Helena Laboratories)
- Espectrofotómetro-----	Pye Unicam SP30 uv (Pye Unicam LTd)
- Evaporadora de oro-----	Fine coat ion sputter JFC-1100 (JEOL)
- Filtros de Policarbonato-----	Nucleopore Corporation
- Fuente de poder-----	Gelman Instrument Company
- Incubadora-----	Water-Jacketed incubator model 3158 (Forma Scientific)
- Microscopio de luz-----	Carl Zeiss (Germany)
- Microscopio de barrido-----	JEOL Scanning Microscope JSM-35C
- Multimetro-----	Sanwa V-70D Multitester (Sanwa Electric Instrument CO.,LTD)
- Punto critico-----	Sample Drying at the critical point Samdri 780-A (Tousimis Research Corporation).

II- METODOS



II = METODOS.

Todos los animales utilizados en este trabajo, se obtuvieron del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Para los ensayos de exposición al asbesto crisotilo y quimiotaxis se emplearon ratas macho cepa Wistar de 250 a 300 g de peso.

Para la obtención de antisueros se emplearon conejos machos cepa Nueva Zelanda de 4 kg de peso.

Se formaron tres grupos con nueve ratas en cada uno, siendo dos de ellos los grupos experimentales y el restante el grupo control. Se utilizaron lotes de tres animales para cada réplica, que en total fueron tres.

Se presenta un diagrama de flujo del método (página 29), en donde se esquematiza la secuencia de la misma. La explicación en detalle de cada paso se dá a continuación.

Dentro de algunos incisos se remite a los apéndices, en los que se detallan las metodologías más específicas según el caso.

II.a) Exposición

El asbesto crisotilo fue proporcionado por el Dr. Arnold Brody del NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), North Caroline, USA. Se horneó a 180°C por 4 h para esterilizarlo (71) y liberarlo de endotoxina (ver apéndice # 1) y se resuspendió en SSI estéril (solución salina isotónica NaCl 0.9%).

Se sonicó en solución por 60 min para reducir el tamaño de las fibras (figura 1) y evitar problemas de obstrucción durante la instilación de los animales.

Las ratas se anestesiaron ligeramente con éter para exponer la tráquea quirúrgicamente y ser inyectado el asbesto en solución, en una dosis de 2.5 mg por rata en un volumen de 0.5 ml.

Los animales control también recibieron una sola inyección de 0.5 ml de SSI estéril. La herida se suturó y las ratas se mantuvieron hasta su sacrificio, que en los grupos experimentales fué de 3 y 24 horas posteriores a la administración del asbesto. Los grupos controles se sacrificaron 3 horas después de la instilación.

Para los estudios morfológicos se utilizó un lote de animales distinto a los que se les realizó el lavado bronquioalveolar que se mantuvieron en las mismas condiciones que los anteriores y fueron dos animales para cada grupo, los cuales fueron: Control,



FIGURA 1

Vista en microscopio de barrido de las fibras de asbesto crisotilo utilizadas para la instilación después de sonicadas (1,540 X).

3 h, 24 h y 8 días (tiempos de sacrificio después de la exposición).

II.b) Estudios Morfológicos y Microanálisis

Los pulmones fueron fijados con solución de Karnovsky (41) por perfusión intratraqueal, al permitir fluir el fijador por gravedad a una presión de 15 cm de agua, para el análisis tanto de microscopía de barrido así como de luz.

Después que los pulmones se expandieron totalmente con el fijador, la tráquea se ligó y los pulmones se extrajeron de la cavidad torácica para ser sumergidos en el mismo fijador por 24 h para su posterior procesamiento (19).

En ambos estudios se hicieron cortes parasagittales de ambos pulmones, al tomar fragmentos de cada uno de los lóbulos.

El procesamiento consistió en la deshidratación, inclusión, corte y tinción con hematoxilina-eosina para estudios morfológicos al microscopio de luz.

Para microscopía de barrido y microanálisis de rayos X, se lavaron varias veces con amortiguador de sacarosa 0.2 M cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4, y se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes para llevar al punto crítico con CO₂ líquido.

Una vez deshidratados se cubrieron con oro en una evaporadora y se montaron en discos de carbón para localizar las bifurcaciones de los ductos alveolares en un microscopio estereoscópico "rasurando" el tejido con una navaja (20).

Para la observación ultraestructural de células pulmonares aisladas, se realizó un lavado bronquioalveolar del cual se separó la fracción celular. Dicha fracción se resuspendió con SSAF (Solución salina amortiguada con fosfatos libre de calcio y magnesio con pH de 7.3) y se contó el número de células para ajustarlo a 2×10^6 células/ml. De esa suspensión se tomaron 50 μ l y se colocaron sobre un cubreobjetos y se mantuvieron a 37°C por 45 min en 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo se lavó a presión la superficie del cubreobjetos con SSAF para eliminar las células que no se adhirieron, y se les dejó en fijador de Karnovsky a 4°C toda la noche. Después se deshidrataron en alcoholes con concentraciones crecientes y se llevó a punto crítico con CO₂. Se montaron en discos de carbón y se cubrieron con oro para su observación al microscopio de barrido.

En el caso de la observación del tejido pulmonar, se analizaron las ramificaciones de los bronquiolos terminales y sus primeras derivaciones que son los ductos alveolares, ya que en la rata los bronquiolos respiratorios no se presentan (19). Dicho análisis consistió en contar el número de macrófagos y fibras de asbesto encontradas. Para confirmar la naturaleza de las fibras de asbesto, se analizó su espectro por Microanálisis de rayos X

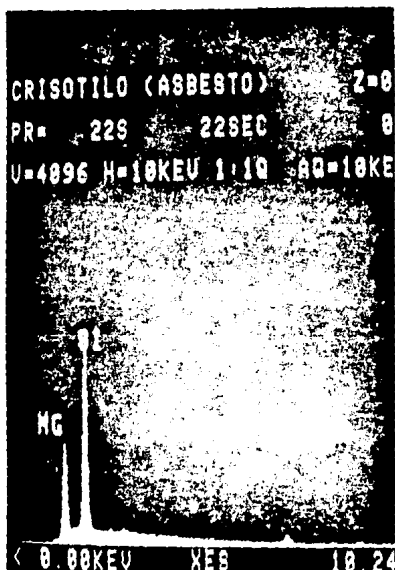


FIGURA 2

Espectro obtenido por microanálisis de rayos X de las fibras de asbesto crisotilo, donde se muestran los picos de Magnesio y de Silicio característicos de la fibra.

(figura 2).

En lo referente a las células aisladas, se determinó el número de células que fagocitaron fibras o estaban en contacto con ellas, para lo cual se analizó toda la superficie en 50 células con microanálisis de rayos X.

II.c) Lavado Bronquioalveolar

Se realizó en ratas sacrificadas con una inyección de Pentobarbital sódico en una dosis de 630 mg por rata, vía intraperitoneal.

Nuevamente se expuso la tráquea para introducir una cánula del número 16, y se sujetó con hilo de algodón. A través de ella se insertó un tubo de plástico que comunicaba a una jeringa situada verticalmente a 10 cm sobre el animal, así el SSAF fluyó por gravedad al interior de los pulmones.

El lavado bronquioalveolar (LBA) se recolectó también por gravedad a un volumen final de 50 ml por cada rata.

Posteriormente se sometió a un primer paso de centrifugación a 250 X g, por 10 min para separar la fracción celular. Con dicha fracción se realizó un conteo total de células, viabilidad y cuenta diferencial (ver apéndice # 2 y 3).

De cada rata se tomó una alícuota del sobrenadante resultante de la primera centrifugación para determinar proteína por el método de Bradford (5). Enseguida se centrifugó nuevamente a 178,000 X g por 105 min para eliminar restos celulares, moco y fosfolípidos (surfactante) (31)

Con el sobrenadante del LBA de tres animales se formó una poza común que se procedió a concentrar en bolsas de diálisis con un poro de 3,500 contra Aquacide (hidroximetilcelulosa) para reducir a un volumen final de entre 3 y 6 ml (44).

Para eliminar las sales que pudieran interferir en los estudios subsiguientes, se dializó contra agua destilada hasta llegar al equilibrio, el que se estableció al medir con un multimetro una resistencia de 100 a 120 Ohms en el agua.

Para determinar esto último se midió la resistencia de 150 ml de SSAF en dos litros de agua destilada, lo cual mostró una resistencia de 100 a 120 Ohms.

Antes de realizar la cromatografía de filtración, se tomaron alícuotas del lavado concentrado para cuantificar proteínas (5) y para el ensayo de quimiotaxis. Para este último, una alícuota se calentó a 56°C por 30 minutos para inactivar proteínas del complemento (83), mientras que la otra se conservó a 4°C.

Todos los pasos incluidos desde la obtención del LBA se llevaron a cabo a 4°C para evitar la modificación de las proteínas contenidas en el lavado.

II.d) Fraccionamiento del lavado bronquioalveolar

La muestra de LBA concentrado se fraccionó en una columna de Sephadex G-100 con dimensiones de 1.5 X 70 cm (83).

La columna se equilibró con SSAF durante 24 h previas a la colocación de la muestra, con un flujo de 8 ml/h. Se eluyeron ochenta fracciones de 2 ml cada una. Antes y después de coleccionar las fracciones, se registró el peso de cada tubo colector, con el fin de conocer la variabilidad del volumen coleccionado y establecer así los ajustes necesarios para la cuantificación de proteína total. Tanto el equilibrio como la elución de fracciones se realizaron en una cámara fría a 4°C.

Para estimar los pesos moleculares de las fracciones eluidas de la columna, ésta se calibró inicialmente con azul dextrán (2,000 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa) y citocromo C (12 kDa). La elución de los picos se estimó espectrofotométricamente, para lo cual se midió la absorbancia de cada fracción a 280 nm, inmediatamente después de ser coleccionadas.

Una vez que se evidenciaron los picos de elución, se tomaron alícuotas de todas las fracciones para cuantificar proteínas (5). Para el ensayo de quimiotaxis se tomaron dos alícuotas de todas aquellas fracciones que constituían los picos, una de ellas se calentó a 56°C por 45 min (para desnaturalizar complemento), y la otra no.

También se tomaron alícuotas de las fracciones no formadoras de picos, cada tres tubos.

II.e) Ensayo de Quimiotaxis

Para evaluar la actividad quimiotáctica con las fracciones obtenidas de la cromatografía de macrófagos alveolares, se utilizaron cámaras de Boyden modificadas (75).

Este método consiste en colocar la sustancia a probar en el compartimento inferior de la cámara, mientras que en el superior se colocan las células que permiten evaluar el fenómeno. Entre ambos compartimentos, existe un filtro de policarbonato a través del cual migran las células si hay estímulo químico.

Esta migración es cuantificada al contar el número de células, observándolas en un microscopio con el objetivo de inmersión en

veinte campos predeterminados.

Los macrófagos alveolares utilizados en este ensayo, fueron obtenidos al lavar los pulmones previamente extraídos de la cavidad torácica de manera similar a la que se describió anteriormente, solo que en este caso, los pulmones son comunicados a la jeringa por medio de la cánula, y se les dá masaje cada vez que el líquido se colecta.

En el primer paso de centrifugación, se recupera la fracción celular y se resuspende con medio amortiguador especial para quimiotaxis (RPMI-1640; HEPES 10 mM y albúmina sérica bovina al 2%). Antes de utilizar las células se analizan haciendo una cuenta diferencial, viabilidad celular y cuenta total. El número de células se ajusta a 1.5×10^6 células/ml y se conservan a 4°C.

De ésta suspensión celular, se tomaron 200 μ l para colocar en la parte superior de la cámara, sobre un filtro Nucleopore con poro de 5 μ m de diámetro. En la parte inferior de la cámara se colocaron 105 μ l de las fracciones cromatográficas a probar. En cada ensayo de quimiotaxis se incluyeron dos controles. Un control positivo, que consistió en suero de rata activado con Zimosán (ZARS) (4). Este último, fue preparado al incubar 1 ml de suero de rata con 10 mg de Zimosán a 37°C por 45 min. Después de la incubación se calentó a 56°C por 30 min, con el fin de desnaturalizar el complemento y asegurar que no hubiera una posterior activación inespecífica en la cámara de quimiotaxis.

Los otros fueron dos controles negativos, uno con el medio amortiguador y el otro con SSAF. Las cámaras se incubaron durante 3 hrs a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Finalizado el tiempo de incubación, se retiraron los filtros para lo cual se dispusieron en canastillas especiales para su tinción. Primero se fijaron en metanol y después se tiñeron con eosina y azur. Los filtros se colocaron sobre un cubreobjetos, y con un hisopo humedecido en SSI, se eliminaron las células de la parte superior (células que no migraron), y se les dejó secar para ser montados con resina sobre un portaobjetos.

La migración de macrófagos se evaluó por dos métodos. Uno por la observación directa a 100 X y el otro por la medición de absorbancia a 640 nm de los filtros en un densitómetro. Con este último método se obtiene una curva, que de acuerdo a la intensidad de la tinción, el tamaño del área medida con un planímetro es directamente proporcional al número de células.

Esto último fue corroborado al realizar previamente un ensayo de quimiotaxis al emplear diferentes diluciones de ZARS con SSAF al (0.025, 0.05, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0%) como sustancia quimioatrayente. Como control negativo se empleó medio amortiguador. Las células fueron obtenidas de ratas diferentes con el fin de considerar la variabilidad de respuesta. Cada concentración y control negativo, se hizo por triplicado, y se evaluó la migración celular por los dos métodos mencionados anteriormente.

Para confirmar que el fenómeno observado no se debiera a una migración al azar o quimioquinesis, se efectuaron pruebas en las que se invirtieron y eliminaron los gradientes de concentración de las fracciones quimiotácticas a probar. Para la inversión de gradientes se colocó la fracción quimiotáctica junto con la suspensión celular en la parte superior de la cámara y medio amortiguador especial para quimiotaxis en la cámara inferior. Por otra parte, para eliminar el gradiente de concentración, en ambos compartimentos, se colocaron las fracciones quimiotácticas a probar, sólo que en la parte superior se acompañó con la suspensión celular.

Una vez realizados los ensayos de quimiotaxis, las fracciones incluidas en los picos de la cromatografía, se liofilizaron para la conservación y concentración de las proteínas y demás componentes presentes en ellas. De esta manera, se contó con proteína suficiente para la estimación de albúmina y C3 por medio de inmunodifusión radial y para la electroforesis.

II.f) Cuantificación de Albúmina y C3 por Inmunodifusión Radial

Para ambas estimaciones se empleó el procedimiento de inmunodifusión radial estándar de Becker (3), con las fracciones liofilizadas y resuspendidas en SSAF, con un contenido de proteína aproximadamente veinte veces mayor respecto al volumen original que tenían las fracciones. Se cuantificó proteína total (5) para conocer su concentración en la suspensión del liofilizado.

La inmunodifusión radial consiste en colocar el antígeno en pozos cortados en una capa de agarosa que contiene incorporado el antisuero correspondiente. Se forman anillos de precipitación cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración del antígeno. Los antisueros utilizados fueron el anti-albúmina y anti-C3 (ver apéndice # 4 y 5).

En este caso, se empleó Agarosa en solución amortiguadora de Barbituratos al 3% con pH 8.6, diluida con SSAF mezclada con el antisuero correspondiente a una dilución de 1:4. Para la estimación de albúmina la alícuota fue diluida veinte veces y la correspondiente a C3, 1:1. Las placas se mantuvieron en cámaras húmedas, para permitir la reacción Ag/Ac. Con la finalidad de asegurar que la reacción llegara al equilibrio, las placas se mantuvieron por 72 h, registrando cada 24 h las medidas del diámetro de los anillos con una lupa de aumento 7X con escala milimétrica.

En el caso de la cuantificación de albúmina la curva patrón se hizo con diluciones seriadas de albúmina de suero de rata (ver apéndice # 6) con SSAF (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16).

11.g) Electroforesis

Con el propósito de conocer la composición de cada uno de los picos eluidos en la cromatografía, se realizó una electroforesis del concentrado de todas las fracciones comprendidas en ellos.

Se empleó la técnica de Laemmli (45) con algunas modificaciones, utilizando geles de Poliacrilamida-SDS al 7.5%, en un amortiguador Tris-Glicina-SDS 0.025 M pH 8.3. Cien microgramos de la muestra con la misma cantidad de la mezcla de digestión [Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8 + Glicerol 10% + B-Mercaptoetanol 5% + SDS 2.3% + Azul de Bromofenol 5%] se calentaron a 100°C por 60 seg antes de colocarse en el gel.

Antes de colocar las muestras se aplicó una corriente constante de 3 mA por gel, con el fin de optimizar las condiciones de la corrida. Esta fué en las mismas condiciones durante un tiempo de 3 a 4 h.

Los geles se fijaron y tñieron a temperatura ambiente con una solución Metanol: Acido Acético: Agua con Azul de Coomassie R-250 (0.1%) durante 18 hrs.

Se destñieron en una solución Metanol: Acido Acético: Agua a 50°C.

Las muestras se corrieron en paralelo con un grupo de proteínas marcadoras de peso molecular con un intervalo de 14 a 669 kDa.

PRUEBAS ESTADISTICAS

Se emplearon pruebas no paramétricas para el tratamiento de datos. Para comparaciones múltiples se empleó la prueba de Kruskal-Wallis con dos colas, y para comparación de dos muestras la prueba de Mann Whitney. En ambas se consideró el nivel de significancia al 0.05%.

En el caso del análisis de los resultados de incidencia de macrófagos y fibras de asbesto en las bifurcaciones, se examinó si el patrón de distribución se ajustaba a una distribución de Poisson mediante la prueba de χ^2 .

III- RESULTADOS

III - RESULTADOS

III.a) Estudios Morfológicos y Microanálisis de rayos X.

En cuanto a los hallazgos histológicos en microscopía de luz, el cambio más sobresaliente fué el aspecto prominente de las primeras bifurcaciones por la acumulación de células mononucleares. En el grupo Asbesto 3 h (figura 3a), sólo algunas de las muestras analizadas presentaron ésta característica, mientras que en el grupo Asbesto 24 h (figura 3b) la mayor parte la presentaban. En el grupo Asbesto ocho días que se incluyó para el estudio morfológico, aparte de la característica ya mencionada, se observó la evidencia de un proceso inflamatorio tanto en paredes de conductos alveolares como de alveolos (figura 3d).

En lo que respecta a los hallazgos del análisis del tejido pulmonar al microscopio de barrido, se demuestra la presencia de fibras de asbesto y células a nivel de la primera bifurcación (figura 2). Por un lado, la cantidad de fibras tendió a disminuir al transcurrir el tiempo (1 a 3 fibras; 4 a 6 y 1 a 3 en los grupos Asbesto 3 h, 24 h y 8 días) (Tabla 1).

El número de bifurcaciones con células se incrementa gradualmente hasta alcanzar porcentajes del 93.3% en el caso del grupo Asbesto 24 h, contra un 76.2% y 16.7% en los grupos Asbesto 3 h y Control (Tabla 1).

En el grupo cuyo sacrificio fue a los ocho días posteriores a la instilación, el porcentaje se abatió hasta un 75%, es decir, casi al mismo valor del grupo 3 h (Tabla 1).

Este mismo comportamiento se hace presente en el número promedio de células que se encontraron en las bifurcaciones examinadas (Tabla 1). En el grupo Control fue de 0.3 células, en tanto en el grupo Asbesto 3 h aumenta a 2.3 células, pero, en el grupo Asbesto 24 h aumenta significativamente (5 células) ($p < 0.05$) y en el de ocho días vuelve a disminuir hasta alcanzar un valor similar al del grupo Asbesto 3 h.

Referente a las células aisladas (Tabla 2), el microanálisis de rayos X (figura 2) mostró que en el grupo 24 h se encontró el mayor porcentaje de células que fagocitaron fibras de asbesto, (36%).

Le sigue en orden de magnitud el grupo Asbesto 8 días con un 22% y el Asbesto 3 h con 20%.

III.b) Lavado Bronquioalveolar

En la fracción celular separada del lavado bronquioalveolar, se analizaron varios parámetros. El primero de ellos fue el conteo celular total por cada rata (Tabla 3). En el grupo Control se

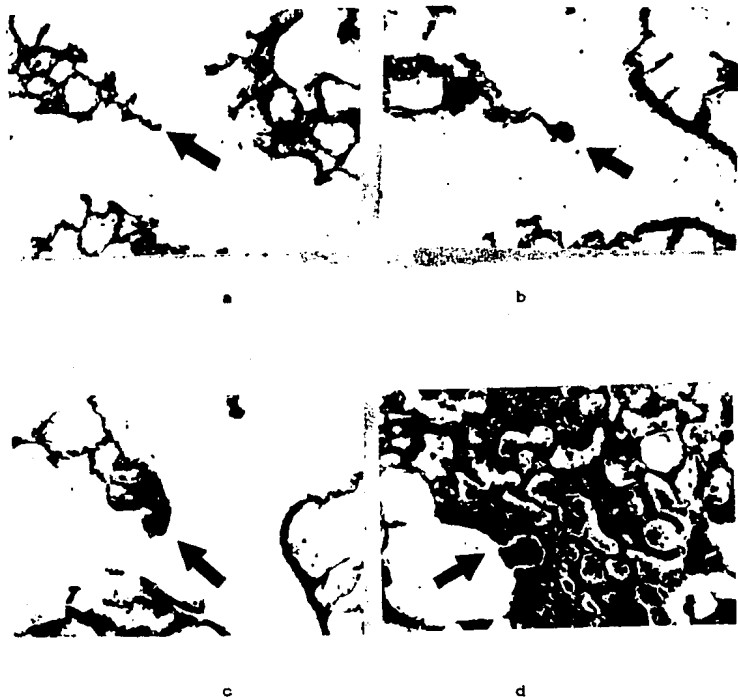


FIGURA 3

Tejido pulmonar observado en el microscopio de luz a 240 X.

- a) Bifurcación de un ducto alveolar en una rata sacrificada 3 h después de la exposición al asbesto.
- b) Bifurcación de un ducto alveolar en una rata después de 24 h de expuesta al asbesto, con engrosamiento del mismo.
- c) Bifurcación engrosada de un ducto alveolar en una rata después de 8 días de exposición al asbesto.
- d) Zona alveolar con un proceso inflamatorio, en una rata sacrificada a los 8 días después de exponerla al asbesto.

TABLA 1

NUMERO E INCIDENCIA DE MACROFAGOS Y FIBRAS DE ASBESTO EN LAS BIFURCACIONES.

Grupo	No. de bif. examinadas	No. \bar{x} de bif. con MOs	No. \bar{x} de MOs en las bif.	% \bar{x} de bif. con fibras	No. \bar{x} de fibras en las bif.
$\bar{x} \pm d.s$					
Control	12	16.7	0.3 \pm 0	0	0
Asbesto 3 h	21	76.2	2.3 \pm 2.4	23.8	+
Asbesto 24 h	15	93.3	5.0 \pm 3.5	20	++
Asbesto 8 días	16	75	2.2 \pm 2.7	31.1	+

bif. = bifurcaciones

+ = 1-3 fibras

++ = 4-6 fibras

TABLA 2

RESULTADOS DEL MICROANÁLISIS POR RAYOS X DE MACROFAGOS ALVEOLARES AISLADOS DE LAVADO BRONQUIALVEOLAR.

Grupo	No. de animales	No. de macrófagos analizados	No. de Macrófagos con asbesto %
Control	2	50	0
Asbesto 3 h	2	50	20
Asbesto 24 h	2	50	36
Asbesto 8 días	2	50	22

tuvo un promedio de 2.8×10^6 células; 4.1×10^6 células en el grupo Asbesto 3 h y 3.7×10^6 células en el Asbesto 24 h. No se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

El segundo parámetro fue la viabilidad celular, la cual disminuyó significativamente ($p < 0.001$) cuando se comparó el grupo Control con los animales sacrificados a las 24 h. Así, mientras que el grupo Control presenta un promedio de 91% de células viables, los grupos de 3 h y 24 h tienen un porcentaje de 90.1% y 83.4% respectivamente (Tabla 3).

Otro dato examinado de la fracción celular fue la cuenta diferencial. En la figura 4, se muestra el porcentaje promedio de macrófagos alveolares, linfocitos y polimorfonucleares para cada grupo. En ellas resaltan varios aspectos, uno consiste en el decremento de macrófagos en los grupos expuestos al asbesto en comparación con el grupo Control (88% vs 79.8% en 3 h y 52.7 % en 24 h).

Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.001$) únicamente al comparar el grupo de 24 h con el Control, ya que entre el de 3 h y el Control no hay diferencia. En cuanto al número de linfocitos se encuentra un incremento significativo ($p < 0.001$) en los grupos experimentales, ya que el Control tiene un porcentaje de 7.8, mientras que los de 3 y 24 h tienen un valor de 13.8% y 15.6% respectivamente. Un aumento más drástico ocurre con los polimorfonucleares, que en el grupo Asbesto 24 h llegan a formar un 31.5% del total de las células, cuando en el grupo Asbesto 3 h y el Control constituyen un 6.2 y 4.1%, respectivamente. Sólo hay diferencias significativas con el grupo Asbesto 24 h ($p < 0.001$).

Al centrifugar el LBA se cuantificó la proteína total en el sobrenadante obtenido, lo que dió un promedio de 3.1 mg/ml de las tres réplicas del grupo Control, 2.6 mg/ml en el grupo Asbesto 3 h y 4.2 mg/ml en el grupo de 24 h (Tabla 4). Existió una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, al haber un incremento en el grupo de 24 h. Sin embargo la variabilidad observada dentro de este último grupo fue considerable.

Después de concentrar el lavado de tres animales, se cuantificó la proteína total del mismo y se obtuvo un intervalo de 8.05 a 17.3 mg para todos los grupos (Tabla 5) con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

TABLA 3

VIABILIDAD Y NUMERO DE CELULAS OBTENIDAS POR LAVADO
DE BRONQUIALVEOLAR

	No. de células totales obtenidas por animal (x 10 ⁶)		Porcentaje de viabilidad	
	$\bar{x} \pm d.s (*)$	Intervalo	$\bar{x} \pm d.s (*)$	Intervalo
Control	2.8 \pm 0.11	1.9 a 4.2	91 \pm 3.34	85.7 a 100
Asbesto 3 h	4.1 \pm 2.45	1.4 a 10.5	90.1 \pm 4.36	77.4 a 96
Asbesto 24 h	3.7 \pm 0.7	1.6 a 6.5	83.4 \pm 6.32	76.6 a 91

(*) Promedio de los triplicados para cada grupo (n=9)

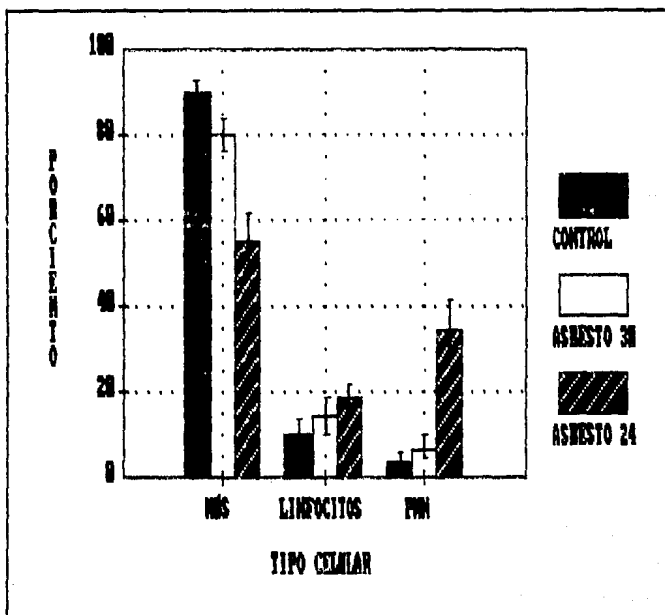
FIGURA 4

Cuenta diferencial de las células obtenidas en LBA.

Porcentaje de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares presentes en la fracción celular de los LBA obtenidos de ratas expuestas al asbesto y sacrificadas posteriormente a las 3 y 24 h. Todos los datos son promedios con desviación estandar de las tres réplicas para cada grupo ($p < 0.05$).

FIGURA 4

CUENTA DIFERENCIAL DE CELULAS OBTENIDAS EN SECRECION
PULMONAR POR LAVADO BRONQUIALVEOLAR



MΦS = MACROFAGOS
PMN = POLIMORFONUCLEARES

* POR CADA GRUPO SE PRESENTA EL $\bar{x} \pm ds$ DEL TRIPLICADO
PARA CADA TIPO CELULAR

TABLA 4

PROTEINA OBTENIDA EN SECRECIÓN PULMONAR POR LAVADO BRONQUIOALVEOLAR.

Grupo	No.de Animales	Proteína obtenida por animal (mg/ml)	
		$\bar{x} \pm d.s$ (*)	Intervalo
Control	9	3.1 ± 1.7	0.65 a 5.5
Asbesto 3 h	9	2.6 ± 1.6	0.5 a 4.4
Asbesto 24 h	9	4.2 ± 4.0	0.5 a 13.7

(*) Promedio del triplicado

TABLA 5

PROTEINA DE LA MUESTRA CONCENTRADA PARA EL FRACCIONAMIENTO EN
SEPHADEX G-100 Y PORCENTAJE DE ALBUMINA OBTENIDA POR
INMUNODIFUSION RADIAL.

Grupo	Réplica	Proteína del concentrado total (mg)		Porcentaje de albúmina respecto a la proteína del concentrado total.

\bar{x}				

Control	1	11.7	71 ± 6	66.8
	2	8.05		
	3	15.6		

Asbesto 3h	1	13.2	77.1 ± 11.5	64.6
	2	12.5		
	3	8.4		

Asbesto 24h	1	15.4	92.4 ± 2.3	94.8
	2	9.6		
	3	17.3		

III.c) Fraccionamiento del Lavado Bronquioalveolar

La muestra concentrada del lavado fue fraccionada por filtración en gel (Sephadex G-100). En las fracciones eluidas se midió la actividad quimiotáctica y la absorbancia a 280 y 595 nm.

El perfil de elución del fluido pulmonar concentrado mantuvo el mismo patrón entre grupos expuestos y el control (figuras 5a, 6a y 7a).

Tanto el patrón de absorbancia a 280 nm y de actividad quimiotáctica, siempre mostraron la presencia de dos picos, uno que eluyó aproximadamente a los 50 ml (pico A) y el otro entre los 100 y 150 ml (pico B), a diferencia de lo observado cuando se determinó proteína y se midió absorbancia a 595 nm, donde sólo se hizo aparente el pico A (figuras 5a, 5b, 6a, 6b, 7a y 7b).

Esto fue reproducible para todos los grupos. Incluso se intentó cuantificar proteína por el método de Lowry (48), sin embargo no se logró detectar señal alguna fuera del pico A. Esta observación se comenta con detalle en la discusión.

De acuerdo a la calibración de la columna efectuada previo al fraccionamiento del lavado, los picos A y B eluyeron a un volumen correspondiente a un peso molecular aproximado de 18 kDa para B y de 100 kDa para A.

Aún cuando la posición de ambos picos fue reproducible en los tres experimentos de cada grupo, la diferencia entre lavados de animales expuestos y controles radicó en la amplitud del pico B y la proporción de los picos A:B. En cuanto a la amplitud, el pico B fue más grande en el de 24 h que en los grupos Control y 3h, con inicio desde el final del pico A hasta las últimas fracciones colectadas. La proporción A:B tendió a disminuir en el grupo de 3 h y 24 h. Al calcular la proporción entre los picos A y B, se obtuvo un valor de 2.52 ± 1.2 para el control de 1.96 ± 0.6 en 3 h y de 1.17 ± 0.4 en 24 h, lo cual indica que el pico B tiende a aumentar con el tiempo (figuras 5a, 6a y 7a).

III.d) Ensayo de Quimiotaxis

Se evaluó la actividad quimiotáctica para macrófagos alveolares en las fracciones formadoras de picos de la cromatografía, así como de las fracciones iniciales, intermedias y terminales.

Al igual que con el patrón de elución (absorbancia a 280 nm), la actividad quimiotáctica cuantificada por conteo celular (100 X), correspondió a los picos A y B (figuras 5b, 6b y 7b) y la diferencia entre grupos experimentales y el control se estableció primordialmente por un incremento del pico B. Es decir, el porcentaje de células que migran en respuesta a quimiotaxinas de bajo peso molecular, es mayor en el grupo de 24 h de exposición

FIGURA 5

Patrón cromatográfico del LBA en Sephadex G-100 representativo del grupo Control.

Medición de absorbancia a 280 y 595 nm (a); Cuantificación de actividad quimiotáctica (b) y estimación de albúmina y C3 (c) de las fracciones eluidas del fraccionamiento del LBA en Sephadex G-100.

Todos los valores se presentan como porcentaje respecto al valor más grande que se obtuvo en las mediciones correspondientes.

FIGURA 5

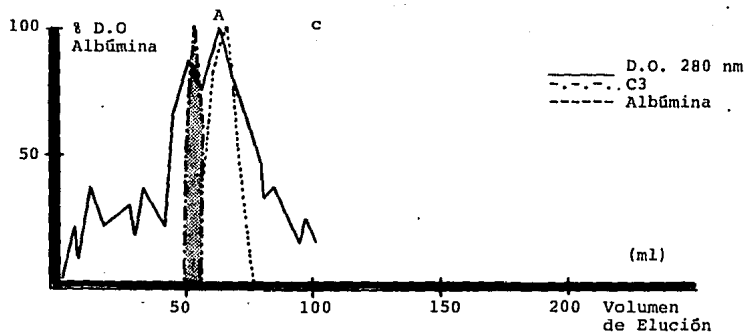
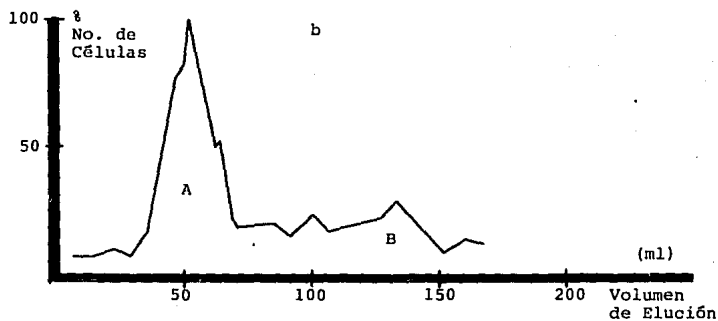
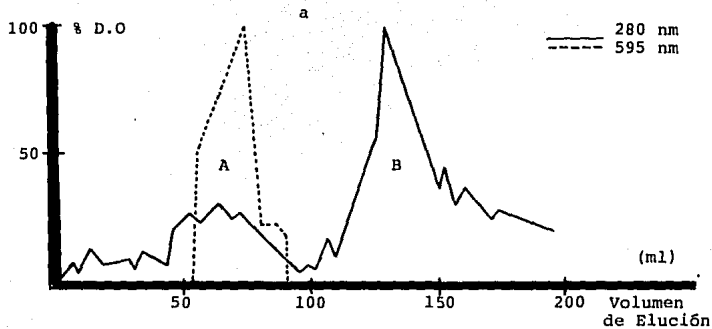


FIGURA 6

Patrón cromatográfico del LBA en Sephadex G-100 representativo del grupo Asbesto 3 h.

Medición de absorbancia a 280 y 595 nm (a); Cuantificación de actividad quimiotáctica (b) y estimación de albúmina y C3 (c) de las fracciones eluidas del fraccionamiento del LBA en Sephadex G-100.

Todos los valores se presentan como porcentaje respecto al valor más grande que se obtuvo en las mediciones correspondientes.

FIGURA 6

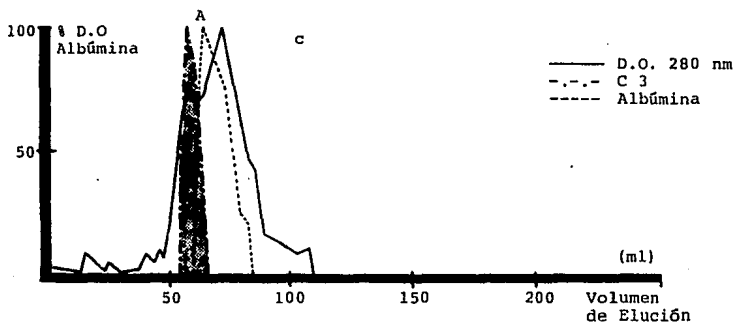
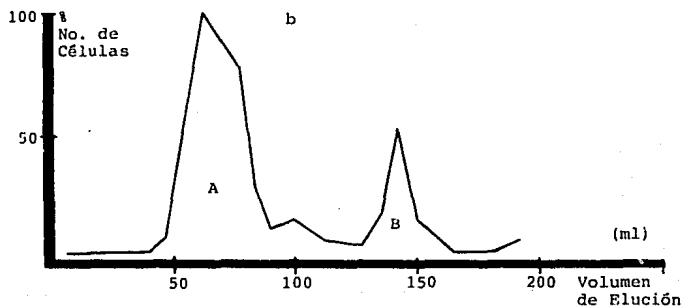
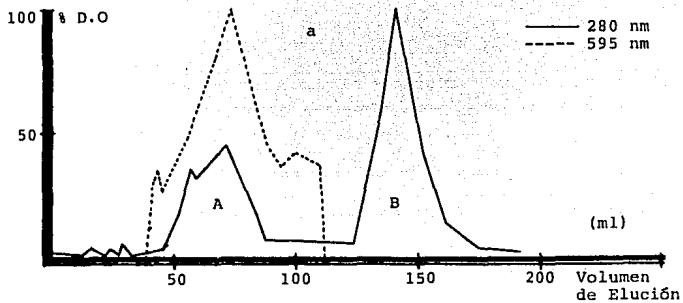


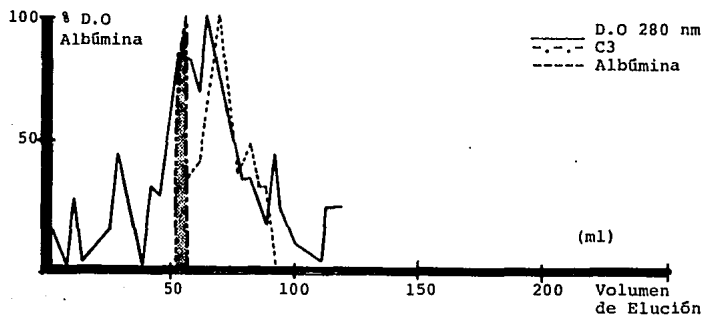
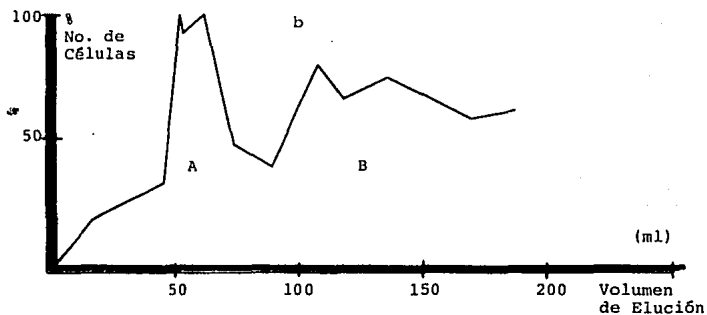
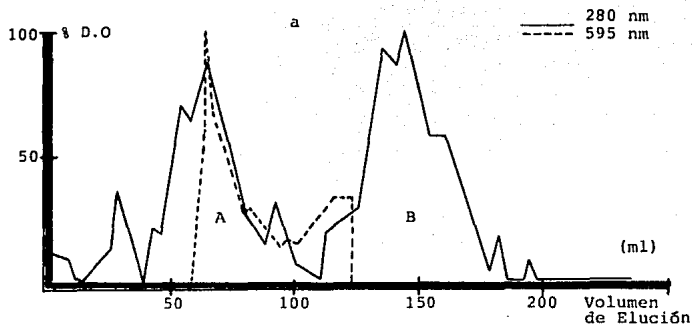
FIGURA 7

Patrón cromatográfico del LBA en Sephadex G-100 representativo del grupo Asbesto 24 h.

Medición de absorbancia a 280 y 595 nm (a); Cuantificación de actividad quimiotáctica (b) y estimación de albúmina y C3 (c) de las fracciones eluidas del fraccionamiento del LBA en Sephadex G-100.

Todos los valores se presentan como porcentaje respecto al valor más grande que se obtuvo en las mediciones correspondientes.

FIGURA 7



que en el de 3 h, y consecuentemente, del control.

Además se encuentra que la actividad quimiotáctica no está localizada a las 24 h, ya que se disemina en las fracciones aledañas al pico B, no diferenciando tan claramente como en el grupo control o en el de 3 h.

Cuando se cuantificó la actividad quimiotáctica por el método de absorbancia a 640 nm en los filtros, se observó un patrón similar. Sin embargo, la definición de los picos no fue tan evidente como con el método anterior. Este método no se consideró adecuado para la evaluación de migración celular.

La actividad quimiotáctica del lavado total concentrado fue abatida al inactivar a 56°C por 45 min, en comparación con el lavado no inactivado.

Lo mismo fue percibido al inactivar bajo las mismas condiciones las fracciones del pico A, en las cuales se agota la actividad quimiotáctica en el caso de este pico, mientras que en el pico B se mantiene. Sin embargo, este comportamiento no fue reproducible para todos los grupos.

Se realizaron pruebas de quimioquinesis al invertir o desaparecer los gradientes con el objeto de corroborar que el fenómeno observado no fuera resultado de una migración al azar, obteniéndose resultados negativos, es decir, no migraron los macrófagos cuando se invirtió o eliminó el gradiente de concentración. Esto demuestra que la migración celular es por quimiotaxis y no por quimioquinesis.

Con los tratamientos empleados para evitar contaminación por endotoxina bacteriana, se aseguró que ésta no interfiriera con los resultados de actividad quimiotáctica. En trabajos previos (30), el tratamiento del material y el asbesto instilado (esterilización con calor seco a 180°C por 4 h y bidestilación del agua empleada en la preparación de SSAF), se demostró por medio del ensayo de detección de endotoxina bacteriana, que ésta no se encontraba presente en las soluciones preparadas bajo estas condiciones.

III.e) Cuantificación de Albúmina y C3 por Inmunodifusión Radial

Con las fracciones formadoras de los picos A y B obtenidas en la cromatografía, se llevó a cabo la cuantificación de albúmina y C3 una vez que se liofilizaron las muestras.

Para la estimación de albúmina, las muestras veinte veces concentradas se resuspendieron veinte veces, con lo cual quedaron a la concentración original, debido a que la cantidad era

excesiva, impidiendo realizar mediciones confiables cuando estaban 20 veces concentradas.

Esto no ocurrió en el caso de la cuantificación de C3, para lo cual sólo se diluyó 1:1. Los datos finales de la estimación de albúmina y C3 se presentan en las figuras 8c, 9c y 10c, y están representados como porcentajes respecto al diámetro mayor del precipitado en la inmunodifusión radial, debido a la carencia del antígeno purificado para la cuantificación de C3. Estos se muestran junto con la absorbancia a 280 nm presentada también como porcentaje, aunque la proporción de la gráfica está amplificada en comparación con el correspondiente patrón de absorbancia a 280nm (parte superior), con el fin de visualizar mejor la distribución de los picos de albúmina y C3 dentro del pico A.

Si bien se intentó utilizar un complejo Zimosán-C3 para la construcción de una curva patrón, la baja proporción de proteína en dicho complejo, condujo a la misma incapacidad para expresar los datos como miligramos de complemento.

En todos los grupos se demarcaron los límites de elución para la albúmina y el complemento. Ambas proteínas se encontraron incluidas en el pico A, hallándose como principal diferencia entre grupos, la proporción de las dos proteínas.

En las figuras 8a, 8b y 8c se representan las fracciones que contienen albúmina y las que tienen C3 contra el diámetro del anillo que cada una dió en la inmunodifusión radial en cada grupo. Se hace notoria la baja proporción de C3 con respecto a la albúmina en el grupo con mayor tiempo de exposición.

Cuantitativamente dicha proporción se calculó al medir el área bajo la curva correspondiente. Los resultados se muestran en la Tabla 6, donde se aprecia que en el grupo de 24 h el valor promedio es más del doble en comparación con el grupo Control y Asbesto 3 h.

Así también, al cuantificar la cantidad de albúmina en cada fracción se logró conocer la proporción de esta proteína con respecto a la proteína total que se obtuvo del lavado concentrado. Estos datos se pueden ver en la Tabla 5, siendo evidente que el valor más grande corresponde al grupo Asbesto 24 h, donde la albúmina alcanza un promedio de $92.4 \pm 2.3\%$ de la proteína total. En los grupos restantes (Control y Asbesto 3 h) se mantiene un promedio de 77.1 ± 11.5 en el primero y de 71.0 ± 6.0 en el segundo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < .001$).

Con el antisuero C3 se encontró reacción con suero de rata normal y con el complejo Zimosan-C3.

El antisuero contra albúmina reaccionó con la albúmina purificada y con suero de rata normal. No se vio identidad entre los dos antisueros.

TABLA 6

PROPORCION DE ALBUMINA Y C3 EN EL PICO A OBTENIDA A PARTIR DE LA IMMUNODIFUSION RADIAL.

Grupo	Réplica	Cantidad de Complemento Area bajo la curva (cm ²)	Cantidad de Albúmina Area bajo la curva (cm ²)	Proporción Albúmina:C3
Control	1	1.33	19.3	14.5:1
	2	1.14	21.1	18.5:1
	3	1.13	27.4	24.2:1
Asbesto 3 h	1	1.63	27.9	17.1:1
	2	1.41	26.1	18.5:1
	3	*	*	*
Asbesto 24 h	1	0.63	36.9	58.6:1
	2	0.21	14.02	66.8:1
	3	*	*	*

* Valores no obtenidos al realizar la inmunodifusión radial por insuficiencia de proteína en las fracciones que el antisuero no reveló.

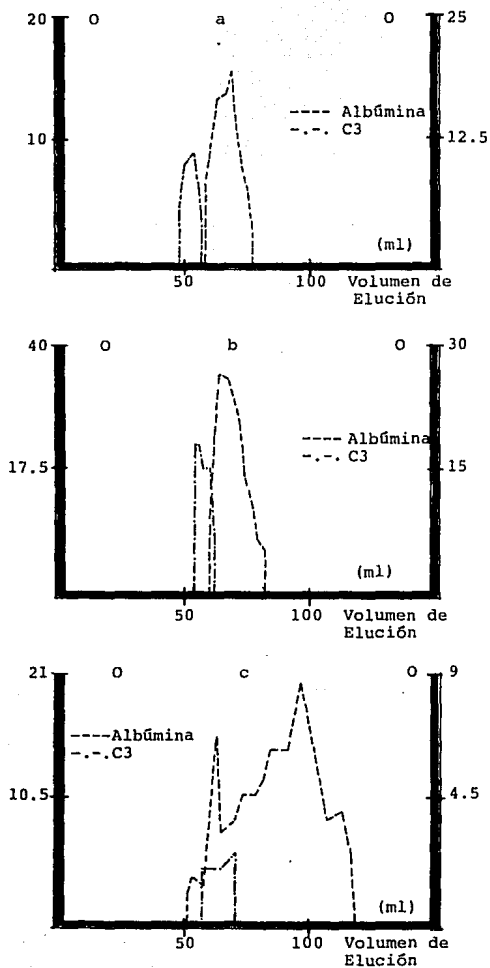
FIGURA 8

Estimación de albúmina y C3 por inmunodifusión radial de las fracciones incluidas en el pico A.

Se presentan los datos obtenidos de la estimación de albúmina y C3 por inmunodifusión radial expresados como el diámetro del anillo del precipitado formado por la reacción con el antisuero correspondiente. Para cada grupo se muestra un ejemplo demostrativo.

- a) Grupo Control
- b) Grupo Asbesto 3 h
- c) Grupo Asbesto 24 h

FIGURA 8



III.f) Electroforesis en geles de Poliacrilamida-SDS

Con las fracciones formadoras de los picos A y B se realizó una separación electroforética para todos los grupos. De los geles se obtuvo un espectro de absorción a 540 nm empleando un densitómetro, y a partir del cual se midió el área bajo la curva con un planímetro para poder calcular la proporción de proteína en cada banda y el coeficiente de migración (Rf) para la estimación de pesos moleculares. Lo mismo se hizo para el lavado total concentrado no inactivado e inactivado de un grupo control así como de suero de rata normal.

En la figura 9 se muestra un gel representativo del pico A obtenido de cada grupo. Se comparan el lavado bronquioalveolar no inactivado, el inactivado y el suero de rata, y se muestra una diferencia en el patrón de bandeos de cada grupo, sobre todo la diversidad en número de bandas y pesos moleculares de las proteínas obtenidas.

En los grupos Control y Asbesto 3 h, se definen en el pico A seis y diez bandas respectivamente, con intervalos de pesos moleculares en el control de 54 a 92 kDa y de 54 a 170 kDa en el grupo 3 h. En cambio, en el pico A del grupo Asbesto 24 h se encuentran de once a doce bandas con intervalos que van de 10 a 120 kDa.

Aún cuando en el pico B no se detectó proteína por el método espectrofotométrico empleado en los grupos Control y 3 h, se pudo constatar la presencia de una banda con un peso molecular aproximado de 60 kDa en dos de las seis réplicas, lo que sugiere que pudiera tratarse de una contaminación por albúmina por ser la proteína más abundante en el lavado bronquioalveolar.

No sucedió lo mismo en el pico B de las réplicas del grupo Asbesto 24 h, debido a que se apreciaron bandas de pesos moleculares bajos (10 a 20 kDa), aparte de la banda correspondiente a 60 kDa.

El patrón electroforético de las proteínas del lavado de animales no expuestos sin inactivar e inactivado, (figura 9), demuestra que el número de bandas es superior en el lavado inactivado con un total de 16 bandas, con pesos moleculares de 10-180 kDa, comparado con las diez bandas observadas en el lavado no inactivado con pesos moleculares entre 10 a 113 kDa.

En el suero de rata normal se perciben hasta 16 bandas de proteína con pesos moleculares que van de a 19 a 180 kDa aproximadamente.



FIGURA 9

Separación electroforética en geles de Poliacrilamida-SDS.

- a) Patrón de suero de rata no expuesta
- b) Lavado bronquioalveolar total concentrado e inactivado a 56°C por 45 min de un grupo control.
- c) Lavado bronquioalveolar total concentrado no inactivado de un grupo control.
- d) Concentrado del pico A obtenido en la cromatografía de un grupo control.
- e) Concentrado del pico A obtenido en la cromatografía de un grupo expuesto 3 h.
- f) Concentrado del pico A obtenido en la cromatografía de un grupo expuesto 24 h.

IV- DISCUSSION

IV.- DISCUSION

La principal enfermedad relacionada con la exposición prolongada al asbesto y reconocida desde los primeros años del siglo veinte, es la fibrosis intersticial pulmonar difusa (6 , 22). Existen varias evidencias en las cuales el macrófago alveolar está implicado en la patogénesis de esta enfermedad (13 , 76), ya que la presencia de este tipo celular es una característica prominente de las lesiones histológicas relacionadas con su exposición.

La información disponible concerniente a la respuesta tisular temprana a fibras de asbesto, ha sido producto de modelos de exposición en animales tanto por inhalación como por instilación intratraqueal. Estos estudios indican que las características histológicas de las lesiones se desarrollan en los sitios de depósito de las fibras, dos o tres días después de la exposición.

Histológicamente, estas lesiones presentan agregados de macrófagos con fibras de asbesto a nivel de las bifurcaciones de los ductos alveolares y persisten hasta 16 meses después de que cesó la exposición experimental (16 , 17).

En el modelo animal empleado en este trabajo la exposición se llevó a cabo por el método de instilación intratraqueal. Este método presenta múltiples ventajas ya que es un método rápido, fácil y reproduce las características histopatológicas de la fibrosis en varios modelos animales. Además la dosis introducida puede ser medida con mayor precisión y su administración es más uniforme en corto tiempo. El depósito de las fibras es independiente del tamaño de la partícula y las de gran tamaño llegan fácilmente a la región alveolar. Aunque la exposición por inhalación es un modelo fisiológico que permite la distribución natural de las partículas inhaladas de acuerdo a su tamaño respirable, frecuentemente requiere de meses de experimentación y de facilidades técnicas elaboradas y costosas (12 , 47).

Sin embargo, ambos métodos de exposición producen en los animales, características histológicas y fisiológicas similares a las de la fibrosis existente en la asbestosis en humanos. La única diferencia importante es que con el método de inhalación, la distribución de partículas es más uniforme que por instilación, en la cual la mayor parte se deposita en la porción central del pulmón.

Con estos antecedentes y al examinar la información generada de los estudios morfológicos en este trabajo, se constató que con el método de instilación, son reproducibles las alteraciones típicas de la asbestosis en cortos lapsos (21).

Los hallazgos histológicos en el análisis al microscopio de luz, revelaron el aspecto prominente de las primeras bifurcaciones por la presencia de cúmulos de células mononucleares (figura 3). Con el microscopio de barrido se demostró la acumulación de

macrófagos en los ductos alveolares y bronquiolos terminales (figura 10), lo que coincidió con los sitios donde se impactan las fibras.

En los trabajos donde se han dado tiempos de inhalación más largos, la acumulación de macrófagos alcanzó un valor promedio de 4.4 células por bifurcación a las 24 y 48 h. Esto es similar a lo encontrado en nuestros experimentos, donde el valor promedio de células por bifurcación fué de cinco macrófagos a las 24 h de la exposición al asbesto (Tabla 1), lo que representa más del doble de las observadas en los animales de 3 h y 8 días. Esto último es de esperarse, ya que el intervalo es lo suficientemente largo y los macrófagos que fagocitaron las fibras posiblemente empezaron a trasladarse al aparato mucociliar o al intersticio, abatiéndose la población observable en los espacios alveolares (18,19).

En el grupo control, el promedio de células observadas en las bifurcaciones, se encontró dentro de los límites normales registrados en otros modelos (65) e invariablemente no se vieron fibras en las bifurcaciones.

En los tiempos estudiados después de la exposición, las fibras se encontraron en la proximidad de las bifurcaciones y su distribución decayó a las 24 h. En las ratas que han inhalado fibras durante una hora y son sacrificadas cuatro u ocho días más tarde, raramente se observan fibras en las superficies de los ductos (19). En nuestro caso, a los ocho días el porcentaje de bifurcaciones que conservan fibras disminuyó, pero tampoco difiere significativamente del grupo Asbesto 3 h (Tabla 1).

Esto puede atribuirse a que el reciclaje de la población fagocítica no ha sido suficiente para depurar las fibras remanentes sobre las superficies alveolares, amén de que la dosis utilizada es mucho mayor a las usuales en exposiciones por inhalación.

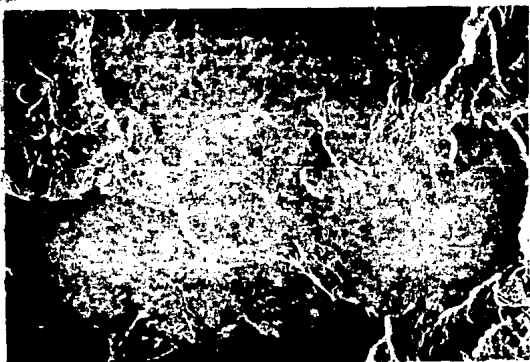
A pesar de ello el número de fibras en las bifurcaciones es menor que las de animales de 24 h.

Como apoyo a estos hallazgos encontramos que en las células obtenidas del LBA de los mismos animales, la cantidad de fibras fagocitadas fue superior en el grupo Asbesto 24 h (Tabla 2), donde el porcentaje de células que mostraron señales de asbesto en su interior fue del 36%, no sucediendo igual en el de 3 h y 8 días, cuyos valores son muy cercanos (20 y 22%). Ello muestra que a los ocho días de la exposición, la actividad fagocítica permanece todavía activa, sin embargo no es suficiente para retirar todas las fibras que se han depositado (figura 11).

El número de macrófagos que contenían asbesto en el grupo 24 h es similar a lo obtenido en exposiciones por inhalación durante 3 h pero con 48 h de recuperación (82), que es de aproximadamente el 30% de los macrófagos lavados.



A



B

FIGURA 10

Micrografía obtenida en el microscopio de barrido del tejido pulmonar de ratas sacrificadas 24 h posteriores a la instilación de asbesto.

a) Primera bifurcación de un ducto alveolar en donde se exhibe una gran acumulación de macrófagos junto con fibras de asbesto (9,200 X).

b) Bifurcación de un ducto alveolar con fibras de asbesto sobre su superficie y células macrofágicas (1,000 X).

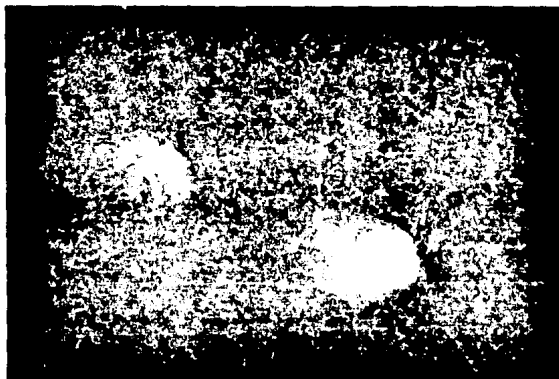


FIGURA 11

Imagen al microscopio de barrido de los macrófagos obtenidos por lavado bronquioalveolar de ratas sacrificadas 24 h posteriores a la exposición al asbesto. Se observa que ambas células han fagocitado fibras (3,450 X).

La diferencia entre los grupos 3 y 24 h demuestra que el lapso transcurrido es suficiente como para que el número de macrófagos que migran al sitio alterado aumente, lo que implica que existe una señal que dirige este movimiento celular.

Con estas observaciones se lograron visualizar los acontecimientos generales que como consecuencia de la instalación de asbesto ocurrieron en el tejido. Para ir más a fondo del fenómeno se analizaron parámetros más específicos con el fin de complementarlos y correlacionarlos con los datos encontrados.

Como primera intención se contó con los datos de la cuantificación de proteína total en el LBA y la valoración de los tipos celulares que pueden hallarse en él.

En el LBA de los animales expuestos a polvos contaminantes, como en este caso el asbesto, ocasionalmente presentan alterados los niveles de proteína total (cuantificada por diversos métodos) o número total de células recuperadas. Por ejemplo, en ratas que inhalaron asbesto crisotilo por una hora y que fueron sacrificadas 24 y 48 h después, no se encontró aumento significativo de proteína total, pero al exponerlas por cinco horas, se incrementó casi al doble de su valor (83).

En otros modelos como la oveja, en tratamientos con grandes dosis de asbesto, también se produjo un aumento a más del doble de la concentración de proteína del fluido pulmonar, pero con dosis pequeñas no se modificó la cantidad (73).

Los datos de proteína total individual que se obtuvieron en el presente estudio (Tabla 4) se encuentran en un intervalo de 2 a 4 mg/ml, lo que muestra concordancia con los trabajos antes mencionados. Las diferencias significativas que se encontraron al observar un incremento entre el grupo 24 h y el control era de esperarse, dado que son dosis más grandes que las experimentadas en otros modelos. Así también los valores de proteína total se encuentran dentro de los valores normales que se han determinado en lavados pulmonares en esta especie y que fluctúa entre 1 a 3 mg/ml (62, 82).

Por otra parte, el análisis de los tipos celulares del LBA mostró un patrón similar a los señalados para la proteína total.

El LBA en condiciones no patológicas, presenta como tipo celular predominante al macrófago alveolar, la existencia de variaciones en el número de la población refleja daño y es relevante para la patogénesis de la enfermedad por asbesto.

Al estudiar la respuesta celular en asbestosis experimentales, y al considerar como modelo a la rata, se han obtenido resultados controversiales en cuanto al número de células totales del lavado y porcentaje de viabilidad. En exposiciones por inhalación no se encontraron diferencias significativas después de sacrificar a los animales a las 48, 72 y 192 h posteriores a la exposición de una hora (16), a diferencia de otros estudios donde por inyección

intratraqueal de fibras de más de 10 μm de longitud y menores de 3 μm , el porcentaje de conteo celular ascendió progresivamente desde una hora hasta los 14 días subsecuentes a la instilación, para retornar a sus valores normales a los 21 y 60 días respectivamente, después del tratamiento (59). Nathan también encontró que incluso los animales control que sólo recibieron solución salina, mostraron cierta tendencia a aumentar el número de células en los subsiguientes días posteriores a la instilación (dicho aumento no mostró ser significativo).

En particular, en nuestro estudio si encontramos aumento significativo de la cuenta celular total del lavado, y del porcentaje de viabilidad, hasta un lapso de 24 h después de la exposición y el valor de los animales control se situó en los valores generalmente reportados (40) (Tabla 3).

Al examinar la situación de cada tipo celular por medio de la cuenta diferencial, nos encontramos con cambios importantes en la población celular (figura 4). El primero de ellos, es la reducción proporcional en el número de macrófagos al exponer las ratas al asbesto. Este cambio es proporcional al tiempo de contacto con la fibra, el cual llegó a alcanzar hasta casi un 50% del total de células en un lapso de 24 h.

El mismo fenómeno se ha visto en personas expuestas al asbesto, donde el decaimiento en el número de macrófagos alveolares va del 81% al 68% respecto al total de las células (76).

En cuanto a los tipos celulares restantes y bajo condiciones normales, los linfocitos y los polimorfonucleares, representan menos del 15 y 5% respectivamente del total de células recuperadas en el lavado bronquioalveolar de la mayoría de las especies, incluyendo humanos (10).

Las alteraciones más relevantes halladas en nuestro modelo, consistieron en un gran incremento en el porcentaje de polimorfonucleares en ratas instiladas con asbesto, específicamente en el grupo 24 h, ya que alcanzaron un valor del 31.5% del total de las células.

Es conocido que después de instilar partículas o drogas el número de polimorfonucleares se incrementa notablemente (15, 18, 49, 82). Esta respuesta generalmente parece estar confinada a modelos de instilación intratraqueal de partículas, ya que los macrófagos pulmonares aparecen como el tipo celular predominante que responde después de exposiciones cortas o largas a fibras de asbesto en aerosol.

Aún cuando los animales no hayan sido expuestos a partículas, el simple lavado ó inyección con solución salina, induce la migración de neutrófilos de los capilares hacia la región alveolar (42).

Es lógico imaginar también que independientemente de la vía de administración, la naturaleza de la respuesta depende del tipo de

agente e influye en el fenómeno migratorio de las células, el cual está mediado por el tipo de factores quimiotácticos generados. Ejemplos de ello, se encuentran en las enfermedades respiratorias humanas como la insuficiencia respiratoria del adulto, donde el porcentaje de polimorfonucleares es de aproximadamente el 85% de la fracción celular (65), atribuyéndose a la producción de un factor quimiotáctico de 10 kDa presente en el lavado.

Otros estímulos como la fagocitosis de bacterias, la exposición a sílice, un solo lavado pulmonar ó la activación de proteínas del complemento, son suficientes para generar quimioatrayentes para polimorfonucleares (23, 24, 29, 31, 34, 42, 52, 74, 82).

Los linfocitos también se encontraron con un incremento significativo en número al compararlo con los animales control. A pesar de que en las exposiciones al asbesto no hay evidencia del papel que juegan exactamente los linfocitos, se piensa que son importantes para atraer fagocitos mononucleares y linfocitos a los sitios de inflamación, debido a su capacidad de producir factores quimiotácticos (28, 76). Si bien el influjo de linfocitos en casos de exposición al asbesto se ha visto incrementado en sujetos expuestos crónicamente, en los modelos animales no se ha detectado el mismo fenómeno (82). De hecho, actualmente no se ha demostrado abiertamente la producción de un factor quimiotáctico específico para linfocitos como ocurre en el caso de los polimorfonucleares. Hartmann (28), encontró dos factores producidos por macrófagos alveolares y linfocitos, cuyas características hacen pensar se trate de Interleucina I y II y que fueron responsables de activar linfocitos. Con la instilación de drogas en el hámster (como la Bleomicina) (40), se ha detectado la secreción macrofágica de un quimioatrayente específico para linfocitos.

Estos datos demostraron una vez más que el asbesto produjo cambios importantes no sólo en la morfología, sino también a nivel bioquímico. En consecuencia, éstos últimos pudieron haber determinado las variaciones numéricas en las poblaciones celulares del LBA evaluadas en nuestro modelo.

Para demostrar ésto, y como primer intento de encontrar modificaciones en algún componente del LBA, se sometió a un fraccionamiento en Sephadex G-100 para poder separar a algunos de sus componentes de acuerdo a ciertas características como es el peso molecular.

Esto último se fundamentó en el hecho de saber que el fluido pulmonar tiene una composición compleja por la variedad de sustancias que lo constituyen, desde iones hasta proteínas, lípidos, carbohidratos, enzimas, étc (55).

Con la cromatografía se obtuvo un patrón característico de separación, que consistió básicamente en dos picos eluidos a pesos moleculares alrededor de 10 y 100 kDa, respectivamente.

Hay que recordar que este patrón de elución se determinó sólo al medir absorbancia a 280 nm, ya que a 595 nm el pico de bajo peso molecular no se hizo aparente (figuras 5a, 6a y 7a). En un estudio donde se efectuó un análisis similar (83), se observó un solo pico de alto peso molecular, debido a que su determinación también fue a 595 nm.

La manifestación de un segundo pico en intervalos de bajo peso molecular, hizo posible visualizar diferencias importantes entre grupos tratados y el grupo control. Mientras que en este último la proporción entre los picos A y B es de 2.5 : 1, en los grupos Asbesto 3 y 24 h cambia a 1.96 : 1 y 1.17 : 1 respectivamente.

Esto puede interpretarse, si se considera que en los animales expuestos al asbesto, una gran cantidad de los componentes del LBA están siendo activados y/o disgregados en moléculas más pequeñas, con el consiguiente incremento del pico R. Sin embargo sería fácil suponer que el pico A tendría que reducirse conforme aumenta el B, lo cual no ocurre. Por lo tanto postulamos que existe un suministro continuo de factores susceptibles a ser activados, y que el pico A no llega a desaparecer, sino al contrario, se incrementa en tal medida que llega a igualarse con el B.

Una explicación posible es la existencia de un mecanismo que provee constantemente de elementos sanguíneos que pasan al espacio alveolar, siendo la trasudación a través de la barrera alveolo-capilar, una de las formas que han sido propuestas por varios autores (26, 33, 43, 70). Cabe también mencionar, que hay diversos componentes en el lavado bronquioalveolar que pueden ser generados in situ. Estas dos posibilidades se discutirán con detalle más adelante.

Al conocer la configuración de los constituyentes del LBA después del fraccionamiento y evidenciados los cambios que surgieron entre grupos expuestos, el siguiente paso consistió en la evaluación de la actividad quimiotáctica para macrófagos en las fracciones eluidas. Además de ubicar en que intervalo de pesos moleculares esta actividad se haría más patente, esta secuencia se consideró una forma adecuada para correlacionar un fenómeno de migración celular con los cambios bioquímicos producidos en el LBA por el asbesto.

En concordancia, estos hallazgos presentan una conducta parecida a la del LBA fraccionado, porque el movimiento de los macrófagos en respuesta a un estímulo quimiotáctico, fue advertida precisamente en las fracciones que forman parte de los picos A y B (figuras 5b, 9b y 7b).

Las proporciones observadas entre los picos A y B al cuantificar la actividad migratoria, experimentan modificaciones importantes cuando se comparan con las obtenidas al medir absorbancia a 280 nm. En los tres grupos el tamaño del pico A es considerable y no se ve alterado en ninguno de los casos. En cambio el pico B se acrecenta en los grupos expuestos al asbesto, sobre todo en el de

24 h, en donde no sólo aumenta significativamente, sino que también el número de fracciones eluidas que abarca se ensancha perdiendo su definición.

En suero normal humano y en suero y lavado bronquioalveolar de modelos animales, se ha comprobado que el asbesto es capaz de activar por la ruta alterna al complemento, liberando factores quimiotácticos (30, 71, 86). Este es un mecanismo de atracción macrofágica al sitio donde se depositaron las fibras de asbesto, y es el factor C5a uno de los principales responsables de la acumulación de macrófagos y de polimorfonucleares (24, 74).

Al seguir como lineamiento esta información, podemos entonces suponer que el fenómeno quimiotáctico que se hizo patente en nuestro modelo, seguramente se debió en gran parte al desdoblamiento de proteínas del complemento. De hecho, en nuestro caso demostramos que hubo trasudación por lo menos de albúmina y C3 al cuantificarlos por medio de antisueros específicos.

Aparte de haber logrado diferenciar claramente los picos de cada proteína dentro del pico A, los datos de la inmunodifusión mostraron dos aspectos sobresalientes:

- Que la cantidad de albúmina se incrementó significativamente en los grupos tratados con asbesto, constituyendo un porcentaje importante de la proteína total.

- Que la proporción entre albúmina y C3 se mantiene constante en el control y 3h y aumenta en 24 h, lo cual establece que el complemento se encuentra disminuido en estos últimos debido a su activación e independientemente de que la concentración de albúmina se haya incrementado.

Estos datos se completaron al considerar también los siguientes puntos:

En los grupos instilados con Asbesto, la migración macrofágica se ve estimulada por factores que fluctúan en pesos moleculares bajos, como se describió con anterioridad, intervalo en el cual podrían situarse los factores C5a y C3a entre otros.

Por otra parte, en el grupo Control donde se logró agotar la migración celular al desnaturalizar con calor las fracciones incluidas en el pico A, que corresponderían al complemento, mientras que las del pico B permanecieron inalteradas, nos sugiere la participación de esta parte del sistema inmunológico humoral (datos no mostrados). Lo mismo puede decirse del LBA total, que cuando es calentada pierde una parte de su capacidad quimiotáctica.

El último dato determinante en la participación del complemento en la generación de quimiotaxinas, fue localizado al remitirse a los cambios entre los picos A y B que se evidencian al medir densidad óptica a 280 nm. A medida que aumenta el tiempo de residencia de las fibras de asbesto, el pico A empieza a

acrecentarse paulatinamente, hasta llegar incluso a igualar su tamaño con el pico B.

Si entre sus componentes el pico A incluye al complemento, esto significaría que tiene un abastecimiento proveniente del trasudado sanguíneo ó por síntesis celular local. Las dos fuentes de proteínas alveolares están bien establecidas (26), por lo que ambas alternativas son posibles. Por un lado nosotros encontramos aumento en el influjo de albúmina, lo cual indica un fenómeno de trasudación. Aunque la segunda opción no fué explorada, no se descarta la posibilidad que los factores quimiotácticos fueran generados in situ.

Debido a que muchas proteínas involucradas en la inflamación y defensa pulmonar también se encuentran en suero, este último debe ser considerado como la fuente principal de muchas de estas moléculas. La albúmina pasa del suero a la superficie del espacio alveolar, así como en dirección opuesta (33) y por ello el uso de la relación albúmina:C3 permite hacer una estimación de la actividad de C3 normalmente presente en la secreción pulmonar.

De tal suerte que si hubo trasudación de suero, se puedan comparar constituyentes del lavado con la albúmina, lo cual es una estimación razonable de cuando una proteína particular ha aumentado o no. (7, 26, 27, 33, 43, 70).

Al haber comprobado el posible incremento de C3 disponible, la producción del fragmento anafiláctico, pudo modificar la permeabilidad capilar o bien, la lesión producida por las fibras, logró dañar la integridad del epitelio lo que permite la exudación incrementada de componentes del suero hacia el alveolo.

Para intentar interpretar estos resultados, nos remitimos a una serie de hallazgos que se han reportado desde hace varios años, con relación a las clases de quimioatrayentes que se han caracterizado en las respuestas inflamatorias, producto de la exposición a partículas, incluyendo al asbesto.

Como se mostró en el cuadro 2, gran cantidad de quimioatrayentes han sido detectados en varios modelos animales así como en humanos; la mayoría de ellos originados por síntesis de macrófagos alveolares y por la activación del factor C5 del sistema del complemento.

Es conocido que las proteínas del sistema del complemento se encuentran en secreción pulmonar de muchas especies (7, 27, 43, 68, 70), y que pueden ser derivados del suero o sintetizados localmente por el macrófago alveolar (1, 15, 53, 59).

Cuando estas proteínas interaccionan con partículas inorgánicas, endotoxinas bacterianas, Zimosán, etc, producen fragmentos cuya capacidad quimiotáctica es bien conocida, en especial la de los fragmentos C5a y C3a originados de C5 y C3 respectivamente.

Como anafilotoxinas que son, son varios los efectos fisiológicos que tienen además de su poder quimioatrayente para leucocitos, polimorfonucleares y macrófagos. Dichos efectos van desde la liberación de histamina, hasta la inducción de contracción muscular y la alteración de la permeabilidad capilar.

La generación de C3a y C5a puede ser por enzimas o por la misma partícula, en el caso del asbesto (35). En realidad el macrófago puede generarlos con las proteasas que libera al ser dañado (17, 18).

Se ha reportado que las concentraciones de proteína que se encuentran normalmente en el alveolo son suficientes para la activación inicial de un factor quimiotáctico (83), y que sin haber daño epitelial, hay una presencia sostenida de proteína que sirve para que las señales quimiotácticas permanezcan hasta 24 y 48 h después de 1 h de exposición.

Asimismo, cierta variedad de proteínas séricas pueden ser recuperadas del pulmón con lavados bronquioalveolares (58) y, es de esperarse que las estructuras alveolares sean más permeables a moléculas de bajo peso molecular, de ahí proteínas menores a 150 kDa son fácilmente difundibles, pero a medida que el peso molecular es progresivamente mayor, son menos capaces de atravesar las barreras normales, a menos que experimenten alteraciones severas.

Nosotros consideramos que hubo trasudación a través de la barrera hemato-aérea, lo que hace fácil aceptar que también lograron pasar otros componentes aparte de la albúmina y el complemento.

Esto explica el que la actividad migratoria de los macrófagos en los grupos expuestos a asbesto, sobre todo en el de 24 h, se difunda en un intervalo muy amplio de pesos moleculares, porque de haber sido C5a o C3a los únicos quimioatrayentes, el pico B sería más definido, o los geles mostrarían la banda característica de dichas anafilotoxinas. En el caso del C5a que es una proteína que sólo migra en condiciones ácidas, (lo cual no se realizó en nuestra separación electroforética) no fue posible evidenciarla, pero la banda de bajo peso molecular que aparece en el grupo Asbesto 24 h, probablemente se trate de C3a (83).

Sin embargo, al haber otras moléculas susceptibles de ser activadas también por el asbesto (prostaglandinas, factor de Hageman, radicales oxigenados, etc) (84), nuestro esquema se amplió si se consideraba al complemento como el único responsable de la actividad migratoria.

Muestra de esto lo revelaron los patrones de bandeo en los geles de electroforesis correspondientes a los picos A y B de los grupos tratados y el control.

En suero de rata normal, se encontró un total de 16 bandas con intervalos de pesos moleculares de 19 a 200 kDa mientras que en el lavado no inactivado aparecen menos bandas, pero al ser

sometido al calor, el desdoblamiento de proteínas aumentó el número de bandas hasta llegar a igualarse a los del suero de rata.

Se ha establecido que el patrón proteico del lavado y suero en la rata es comparable principalmente en la región de bajo peso molecular, ya que en la de pesos altos, sólo dos de las proteínas corresponden (58) y cinco no son comparables a las del suero.

En particular nuestro patrón electroforético del lavado sin inactivar no mostró todas las proteínas características del fluido pulmonar, pero sí algunas compatibles con el suero. En el lavado inactivado, se reconoció una banda exclusiva del mismo (32 kDa). En ambos se presentó una banda de bajo peso molecular (10 kDa) que no se distinguió en suero pero sí en el pico A del lavado del grupo de 24 h.

Como es de esperarse el número total de proteínas encontradas en el pico A, no es mayor que las normalmente determinadas en el suero debido a que sólo son una fracción de las proteínas del lavado bronquioalveolar, que de hecho son menos numerosas que las del suero.

Para apoyar el hecho de que en los grupos tratados hubo trasudación de suero al alveolo, se muestra la aparición de proteínas en intervalos más amplios de peso molecular. Sólo en el grupo de 24 h se presentaron pesos moleculares tanto altos como bajos. Fue el único que mostró esta característica.

Esto significa que al haber un espectro más amplio de proteínas y otras moléculas, la probabilidad de interacción de las fibras de asbesto fue favorecida y consecuentemente generaron fragmentos de varios tamaños, algunos de ellos con capacidad quimioatrayente y posiblemente no sólo para macrófagos sino también para otro tipo celular, como los polimorfonucleares.

Esto último puede explicar el porqué la migración celular se percibió en un amplio intervalo de pesos moleculares pequeños, y la absorbancia a 280 nm fue tan significativa en el pico B del grupo de 24 h.

Por otro lado, la presencia de proteínas con bajo peso molecular que se detectó en la electroforesis del pico A del grupo asbesto 24 h, sostienen lo expresado anteriormente. Aunque esto no ocurrió en el pico B, esto se debió probablemente a que correspondían a pesos moleculares tan pequeños, que si fueron péptidos o de naturaleza no proteica como la mayoría de los quimioatrayentes ya comprobados, el método no lo detectó por su especificidad.

Estas y otras razones explican el porqué tampoco pudo cuantificarse proteína en el pico B por los métodos de Bradford y Lowry, y que su absorbancia a 280 nm fuera tan sobresaliente. Cabría señalar que en el caso de haber existido proteína debió de estar tan diluida o en tan baja concentración, que incluso con la

inmunodifusión radial no logró detectarse a pesar de que las muestras se concentraron veinte veces.

Tal vez alguno de estos factores originados por contacto directo de las fibras con componentes del lavado o por inducción por los mismos macrófagos, al secretar gran gama de sustancias con capacidad hidrolítica, puedan pertenecer a algunos de los que ya se ha comprobado su capacidad quimioatrayente pero aún no se caracterizan (Cuadro 2).

Retomando los hallazgos que se encontraron en nuestro modelo, desde los morfológicos hasta los bioquímicos, podemos comprender en parte los fenómenos que se llevaron a cabo como resultado de la instilación de asbesto.

En este modelo de exposición experimental in vivo, se lograron reproducir las características histológicas de daño causado por fibras de asbesto, en los tiempos de exposición establecidos.

La acumulación de macrófagos alveolares en las bifurcaciones de los ductos alveolares, sitio preferencial de depósito de las fibras, semeja a aquellas lesiones que ocurren en humanos y en asbestosis experimentales, de ahí que sea una característica notable de la respuesta tisular temprana al asbesto inhalado.

Los mecanismos por los que los macrófagos son reclutados se conocen parcialmente a la fecha, e involucran en el proceso a la liberación de quimioatrayentes por el macrófago o por la activación de componentes de la secreción pulmonar, como es el caso del complemento.

Ambos argumentos son posibles, dado que en nuestro estudio pudimos percatarnos de ello, al saber que la existencia de trasudación sanguínea hacia los espacios alveolares, es una fuente potencial de moléculas con posible capacidad quimiotáctica al interactuar con los macrófagos alveolares o las fibras de asbesto.

No debe olvidarse que también el macrófago per se, dado su conocido potencial secretorio, es otra alternativa de producción de quimiotaxinas incluso para tipos celulares diferentes.

Esto nos conduce a considerar la complejidad que representa un modelo in vivo, por la gran cantidad de variables que pueden dificultar la interpretación de los resultados, pero a la vez nos induce a la necesidad de explorar in vitro otras posibilidades.

Entre las más importantes, está la trasudación sérica que impide visualizar el papel directo que ejerce la partícula sobre el lavado. La diversidad de respuesta individual a la exposición, determina en gran parte la intensidad de daño producido por el asbesto.

Así, entre cada animal las condiciones fisiológicas, inmunológicas, la eficacia de los medios de remoción, ventilación pulmonar, etc, modifican la respuesta.

Con el uso de este tipo de modelos, la información recabada es de gran valor para poder llegar a dilucidar los eventos biológicos que se desencadenan en respuesta a la agresión de partículas ajenas al organismo.

Con la ayuda de estos modelos, podría establecerse un conjunto de pruebas que nos permitieran comprender y predecir el posible riesgo que representan las partículas que normalmente se encuentran en el ambiente, y su relación con el desarrollo de patologías cuya etiología se desconoce.

De esta manera, al vigilar zonas con altos niveles de contaminación e incidencia de enfermedades respiratorias, se podrían efectuar estudios detallados en la aplicación de técnicas que nos permitan acercarnos cada vez más a la etiología de las mismas.

Una vez obtenido este conocimiento se podría llegar a establecer una terapéutica más adecuada, o bien medidas preventivas que impidan el aumento tan notable de enfermedades respiratorias que hoy en día tienen lugar.

SALIR DE LA BIBLIOTECA NO DEBE

V- CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

- En primer término se logró reproducir las alteraciones morfológicas propias de la exposición al asbesto, caracterizadas por la acumulación de macrófagos alveolares en las bifurcaciones de los ductos alveolares, mismas donde se depositaron las fibras de asbesto.
- Se constató que los quimioatrayentes juegan un papel primordial en el reclutamiento de macrófagos y que probablemente se derivan en gran parte de la activación del complemento.
- Se comprobó que el fenómeno de trasudación provee de componentes susceptibles de interactuar con fibras y macrófagos (prostaglandinas, factor de Hageman, radicales óxido) y al igual que el complemento generar factores quimiotácticos.
- Se observó que otros tipos celulares pueden ser atraídos al sitio de depósito, como son los polimorfonucleares y participar también en el desarrollo de las lesiones.
- Se sugiere que el paso a seguir sería utilizar técnicas que definan más el tipo de quimiotaxinas producidas, como cromatografías con resinas que tengan mayor poder de definición y métodos para caracterizar moléculas de naturaleza parcialmente o no proteica (lípidos, glucoproteínas, carbohidratos, aminoácidos, etc), e intentar caracterizar bioquímicamente algún factor en específico. Con ello se podría probar en este tipo de sistemas, otras partículas con capacidad tóxica desconocida o sólo comprobada en modelos in vitro, como es el caso del polvo de Mexicali.
- Finalmente se pretende estudiar con más detalle la interacción partícula-célula por medio de cambios a nivel de membrana plasmática a través de la evaluación de la actividad de enzimas contenidas en la misma.

VI- RESUMEN

VI.-RESUMEN

La exposición a una serie indefinida de partículas inorgánicas patogénicas ha sido motivo de estudios experimentales que pretenden establecer los eventos iniciales que dan lugar a patologías respiratorias como las Neumoconiosis.

En la Asbestosis ya se conoce que la respuesta tisular inicial se caracteriza por la acumulación de macrófagos alveolares en los sitios de depósito de las fibras que se atribuye a factores quimiotácticos derivados primordialmente del complemento.

Nuestro estudio mostró que aparte de estos factores, participan otros en éste fenómeno (como los derivados de factores séricos). Sin embargo es de suponer participan en la alteración tisular.

En el lavado bronquioalveolar de ratas expuestas a asbesto crisotilo, la actividad migratoria se exacerbó por factores de bajo peso molecular, entre ellos algunos posiblemente derivados del complemento. Al cuantificar albúmina y C3 por medio de antiseros específicos, se comprobó que el complemento fue abatido por la activación de las fibras, y que la albúmina aumentó significativamente, demostrando que hubo trasudación de componentes séricos al interior del alveolo, y por lo tanto posibles fuentes de los quimioatrayentes no atribuidos al complemento.

Esto sugiere que la exposición aguda al asbesto produce cambios morfológicos y bioquímicos en el pulmón y sus secreciones, lo que implica al macrófago alveolar como el principal responsable del proceso inflamatorio.

VII- APENDICES

VII - APÉNDICES

1) Tratamiento de material utilizado en la obtención y manejo del lavado bronquioalveolar:

Debido a que la endotoxina bacteriana es capaz de activar proteínas del complemento por la vía alterna, al igual que el Zimosán (85, 87), todo el material se trató para dejarlo libre de endotoxina y de este modo evitar que se llevara a cabo una activación inespecífica del complemento en el LBA, y alterara así la interpretación de los resultados. Para ello, el material de vidrio y metal (tubos colectores de fracciones; pipetas; celdas de cuarzo; cánulas, etc) se calentó por 4 h a 180°C.

Las jeringas y tubos de material plástico se esterilizaron con gas en Central de Equipos y en Cirugía del Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez ".

2) Conteo celular y Viabilidad:

Las células obtenidas del segundo paso de centrifugación del LBA, se resuspendieron en 5 ml de SSAF o medio amortiguador (en el caso específico del ensayo de quimiotaxis).

Se tomó una alícuota de 100 µl agregándole 400 µl de azul tripán al 0.05% en SSI, para observar viabilidad por exclusión del colorante, simultáneamente al conteo. De esta mezcla se tomó una alícuota para contar en un hemocitómetro las cuadrículas destinadas al conteo de glóbulos blancos. Para obtener el número total de células, se realizaron los siguientes cálculos:

Número de células / 4 X 5 X 10 X 10³ = Número de células / ml

La viabilidad se calculó de la manera siguiente:

Porcentaje de Viabilidad = Número de céls. teñidas / Número total de céls X 100

3) Cuenta Diferencial:

Después de haber obtenido la cuenta total y el porcentaje de viabilidad, la suspensión celular se centrifugó a 250 X g por 10

min. El paquete celular se resuspendió con 500 μ l del sobrenadante, se tomaron de 2 a 3 gotas para colocarlas sobre un portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Ya secas, se fijaron en metanol y se tiñeron con eosina (0.1%) y azur (0.044%) por 120 y 60 seg, respectivamente, y enjuagaron con agua destilada entre ambos colorantes y al finalizar la tinción.

Se montaron con resina para su posterior observación y conteo de 200 células a 40 X .

6) Obtención del Suero Anti-C3 de rata:

Para la obtención de este suero se incubaron 15 ml de suero de rata con Zimosán (previamente hervido 30 min en agua destilada y lavado 6 veces con SSAF), en una concentración de 10 mg/ml a 37°C durante 30 min con agitación cada 10 min.

Se hicieron entonces un total de 6 lavados con SSI para recuperar el complejo Zimosan-C3 (62).

Se llevó a cabo el siguiente programa de inmunización con el complejo Zimosan-C3:

DIA 1: 150 mg/ml via intramuscular
DIA 15: 150 mg/ml via intramuscular (Refuerzo)
DIA 22: 150 mg/ml via intramuscular (Refuerzo)
DIA 29: Obtención de suero por punción cardiaca que tuvo un título 1:8 por inmunodifusión doble (64).

4) Obtención y Purificación de albúmina sérica de rata:

La albúmina de rata fue obtenida del suero de rata por precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio (36). Al filtrar el precipitado obtenido correspondiente a las globulinas se desechó, mientras que en el filtrado se precipitó nuevamente con sulfato de amonio para separar la albúmina. Este precipitado se disolvió en agua destilada para ajustar el pH a 4.9 con ácido sulfúrico y sulfato de amonio 0.1 N. Se añadió nuevamente sulfato de amonio a 15°C y el precipitado formado se filtró y almacenó a 4°C para los subsiguientes pasos de purificación.

La albúmina así obtenida se dializó en agua destilada y se concentró con Aquacide a un volumen final de 4 ml, los cuales se introdujeron a una columna de Sephadex G-100 con dimensiones de 21 X 2.2 cm, previamente lavada y equilibrada con SSAF con un flujo de 1.5 ml/min.

Se colectaron 50 fracciones con 3.5 ml cada una, y aquellas que

formaron un pico al medir densidad optica a 595 nm correspondiente al peso de la albúmina, se reunieron para concentrarlas en un volumen de 14 ml con una concentración final de 1 mg/ml.

Todos los pasos se realizaron a 4°C. Para comprobar la pureza de la albúmina obtenida, se realizó una electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS y utilizando como referencia proteínas de peso molecular conocido, se identificó la existencia de una banda prominente en el gel, correspondiente a un peso molecular aproximado de 60 kDa.

5) Obtención de Suero Anti-Albúmina de rata:

Con la albúmina de rata purificada se inculó un conejo con el siguiente programa de inmunización:

DIA 1: 1 mg/ml vía intramuscular con adyuvante completo de Freund 1:1

DIA 8: 1 mg/ml vía intramuscular

DIA 16: 1 mg/ml vía intradérmica

DIA 31: 1 mg/ml vía intradérmica

DIA 46: 1 mg/ml vía subcutánea

DIA 61: 1 mg/ml vía intravenosa

DIA 63: Obtención de suero por punción cardíaca que tuvo un título de 1:4 por Inmunodifusión doble (64)

VIII- BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Adams O.D., Hamilton A.T. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 2: 283
- 2) Beck E.G., Jbignon (Eds) (1985). In vitro effects of mineral dusts. Springer-Verlag. Germany. pp: 548
- 3) Becker W (1969). Determination of antisera titers using the single radial immunodiffusion method. *Immunochemistry* 6: 539
- 4) Brade V., Lee G.D., Nicholson A., Shin H.S., Mayer M.M. (1973). The reaction of zimosan with the properdin system in normal and C4 deficient guinea-pig serum. *Immunology* 111:
- 5) Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248
- 6) Becklake M.R. (1982). Asbestos-related diseases of the lungs and pleura: Current clinical issues. *Amer Rev Resp Dis* 126: 187
- 7) Bell Y.D., Haseman A.J., Spock A., McLennan G., Hook R.E.G. (1981). Plasma proteins of the bronchoalveolar surfaces of the lungs of smokers and nonsmokers. *Amer Rev Resp Dis* 124: 72
- 8) Bitterman R.P., Rennard I.S., Crystal G.R. (1981). Environmental lung disease and the interstitium. *Chest in Medicine* 2: 393
- 9) Brain D.J., Knudson F.O., Sorokin P.S., Davis A.M. (1976) Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Env Res* 11: 13
- 10) Brain D.J. (1980). Macrophage damage in relation to the pathogenesis of lung diseases. *Env Health Perspect* 35: 21
- 11) Brain D.J. (1985). Bronchoalveolar Lavage. In: Witschi P.H., Brain D.J. *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol 75). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 12) Brain D.J., Valberg A.P., Sneddon S. (1985). Mechanisms of aerosols deposition and clearance. In: Moren F., Newhouse M.T. and Dolovich M.B. (eds). Elsevier Science Publishers (Biomedical Division). Brain D.J., Valberg A.P.
- 13) Brain D.J. (1986). Toxicological aspects of alterations of pulmonary macrophage function. *Am Rev Pharmacol Toxicol* 26: 547

- 14) Brain D.J., Bloom B.S., Valberg A.P., Gehr P. (1987). Retention and diagnostic uses of magnetic aerosols in the respiratory tract. In: Hofmann W. Deposition and clearance of aerosols in the human respiratory tract. ed Vienna Facultas Universitätsverlag.
- 15) Brain D.J. Macrophages in the respiratory tract. En: Handbook of Physiology: The Respiratory System I. Chapter 14: 447
- 16) Brody R.A., Hill H.L., Adkins B. Jr., O'Connor W.R. (1981). Chrysotile asbestos inhalation in rats: Deposition, Pattern and Reaction of alveolar epithelium and pulmonary macrophages. Amer Rev Resp Dis 123: 670
- 17) Brody R.A., Hill H.L. (1982). Interstitial accumulation of inhaled chrysotile asbestos fibers and consequent formation of microcalcifications. Am J Pathol 109: 107
- 18) Brody A.R., Roe W.M. (1983). Deposition pattern of inorganic particles at alveolar level in the lungs of rats and mice. Amer Rev Rep Dis 128: 724
- 19) Brody A.R. (1986). Pulmonary cell interactions with asbestos fibers in vivo and in vitro. Chest 89: 155S
- 20) Brody R.A., Warheit B.D., Chang Yi Li., Roe W.M., George G., Hill H.L. Initial Deposition pattern of inhaled minerals and consequent pathogenic events at the alveolar level. Ann N Y Acad Sciences 108
- 21) Cadieux A., Masse S., Sirois P. (1983). Effect of asbestos on the metabolism of vasoactive substances in isolated perfused guinea-pig lungs. Env Health Perspect 51: 287
- 22) Craighead E.J., Mossman T.B. (1982). The pathogenesis of asbestos-associated diseases. New England Journal of Medicine 306 (24): 1446
- 23) Dauber H.J., Daniele P.R. (1978). Chemotactic activity of guinea-pig alveolar macrophages. Amer Rev Resp Dis 117: 673
- 24) Fine R., Shaw O.J., Rogers R.W. (1981). Effects of C5a on baboon alveolar macrophage migration. Amer Rev Resp Dis 123: 110
- 25) Fitzgerald X.M., Carrington B.Ch., Gaensler A.E. (1973). Environmental Lung Diseases. Med Clin North Amer 57 (3): 593
- 26) Gellert R.A., Perry D., Langford A.J., Riches G.P., Rudd M.R. (1985). "Asbestosis": Bronchoalveolar lavage fluid proteins and their relationship to pulmonary epithelial permeability. Chest 88 (5): 730
- 27) Giclas C.P., King E.T., Baker I.S., Russo S., Henson M.P.

- (1987). Description of an inhibitor of C3 activation. *Amer Rev Resp Dis* 135: 403
- 28) Hartmann P.d., Georgian M.M., Oghiso Y., Kagan E. (1984). Enhanced interleukin activity following asbestos inhalation. *Clin Exp Immunol* 55: 643
 - 29) Henson M.P. et al. (1979). Complement fragments, alveolar macrophages and alveolitis. *Amer J. Pathol* 97: 93
 - 30) Hernández Rodríguez N.A. (1987). Identificación de complemento en secreciones pulmonares de rata y su activación in vitro por polvos inorgánicos. Tesis para obtener el grado de licenciatura en Q.F.B. U.N.A.M. Facultad de Química
 - 31) Hoffman M.R., Claypool D.W., Kaytal L.S., Singh G., Rogers M.R., Dauber H.J. (1987). Augmentation of rat alveolar macrophage migration by surfactant protein. *Amer Rev Resp Dis* 135: 1358
 - 32) Hughes M.J., Weill H. (1986). Asbestos exposure: quantitative assessment of risk. *Amer Rev Resp Dis* 133: 5
 - 33) Hunninghake W.G., Gadek E.J., Kawanami O., Ferrans J.v., Crystal G.R. (1979). Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J. Pathol* 97 (1): 149
 - 34) Hunninghake W.G., Galin I.J., Fanci S.A. (1978). Immunologic reactivity of the lung. The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. *Amer Rev Resp Dis* 117: 15
 - 35) Jaurand M.c., Gaudichet A., Sebastien P., Rignon J. (1980). Relationship between the number of asbestos fibers and the cellular and enzymatic content of bronchoalveolar fluid in asbestos exposed subjects. *Bull Europ Physiopathology Resp* 16: 595
 - 36) Kabat A.E., Mayer M.M. (1958). *Experimental Immunochemistry*. Charles C. Thomas Publisher.
 - 37) Kagan E., Jacobson J.R. (1983). Lymphoid and plasma malignancies: Asbestos-related disorders of long latency. *Am J.Clin Pathol* 80 (1): 14
 - 38) Kagan E., Oghiso Y., Hartmann D.P. (1983). Enhanced release of a chemoattractant for alveolar macrophages after asbestos inhalation. *Amer Rev Resp Dis* 128: 680
 - 39) Kagan E. (1985). Current perspectives in asbestosis. *Annals of Allergy* 54 (6): 164
 - 40) Kaelin M.R., Center M.d., Bernardo J., Grant M., Snider L.S.

- (1983). The role of macrophage-derived chemoattractant activities in the early inflammatory events of bleomycin-induced pulmonary injury. *Amer Rev Resp Dis* 128: 132
- 41) Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde mixture of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137
 - 42) Kazmierowski A.J., Gallin f.J., Reynolds Y.H. (1977). Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. *J Clin Invest* 59: 273
 - 43) Kolb W.P., Kolb M.L., Wetsel A.R., Rogers R.W., Shaw O.J. (1983). Cuantitation and stability of component of complement (C5) in bronchoalveolar lavage fluids obtained from non-human primates. *Amer Rev Resp Dis* 123: 226
 - 44) Lam S., Le Riche C.J., Kijek K. (1985). Effect of filtration and concentration of bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 87 (6): 740
 - 45) Laemli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680
 - 46) *Lecturas en materia de seguridad social (Enfermedades del trabajo)*. IMSS (1983).
 - 47) Lemaire I. (1985). Characterization of the bronchoalveolar cellular response in experimental asbestosis (Different reactions depending on the fibrogenic potential). *Amer Rev Resp Dis* 131: 144
 - 48) Lowry O.H., Rosenberg N.J., Farr H.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem* 193: 265
 - 49) Lugano M.E., Dauber H.J., Daniele P.R. (1983). Silica stimulation of chemotactic factor release by guinea-pig alveolar macrophages. *J Reticuloendothelial Society* 30 (5): 381
 - 50) Lugano M.e., Dauber H.J., Daniele P.R. (1982). Acute experimental silicosis. Lung morphology, histology and macropahge chemotaxin secretion. *Am J Pathol* 109: 27
 - 51) Lyons R.c., LipsComb F.M. (1983). Alveolar macrophages in pulmonary immune responses: Role in the initiation of primary immune responses and in the selective recruitment of T lymphocytes to the lung. *J Immunol* 130 (3): 1113
 - 52) Merrill W.W., Naegel P.G., Mathay A.R., Reynolds Y.H. (1980). Alveolar macrophage-derived chemotactic factor. Kinetics of in vitro production and partial characterization. *J of Clin Invest* 65: 268

- 53) Merrill W.W., Goodenberger, D., Strober, W., Matthay A.R., Naegel P.G., Reynolds Y.H. (1980) Free secretory component and other proteins in human lung lavage. *Amer Rev Resp Dis* 122: 157
- 54) Martin R.T., Ayers G., Butler J., Altmann C.L. (1984). The comparative toxicity of volcanic ash and quartz: Effects on cells derived from the human lung. *Am Rev Resp Dis* 130: 776
- 55) Masson L.P., Heremans F.J., Prignot J. (1965). Studies on the proteins of human bronchial secretions. *Biochimica et biophysica Acta* 111: 466
- 56) Miller K., Calverley A., Kagan E. (1980). Evidence of quartz-induced chemotactic factor for guinea-pig alveolar macrophages. *Environ Res* 22: 31
- 57) Mitchell R.S., Judson F.N., Moulding T.S., Weiser P., Brock L.L., Kelble A.L., Pollard J. (1979). Effects of urban air pollution. Special considerations of aerosols at 1500 m and above. *JAMA* 242: 1163
- 58) Muller B., Wichert Von P. (1984). Identical serum proteins and specific bronchoalveolar lavage proteins in the adult human and the rat. *Am Rev Resp Dis* 130: 674
- 59) Nathan F.C. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319
- 60) Olenchock A.S., Mull C.J. (1980). Volcanic ash and human complement. *Life Sciences* 28: 791
- 61) Oghiso Y., Kagan E., Brody R.A. (1984). Intrapulmonary distribution of inhaled chrysotile and crocidolite asbestos: Ultrastructural features. *Br J Exp Path* 65: 467
- 62) Osornio V.A.R. (1985). Identificación de partículas contaminantes atmosféricas como patógenos pulmonares en México. Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias Médicas. U.N.A.M. Fac. de Medicina.
- 63) Osornio V.A.R., Seoane M., Yañez B.A. (1986). Enfermedad intersticial pulmonar asociada con la inhalación de polvos inorgánicos ambientales. *Rev Invest Clin* 38: 59
- 64) Ouchterlony O., Nilsson L.A. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: *Handbook of experimental immunology*. Weir D.W. 3th Edition. Ed Blackwell sci publ. London
- 65) Parsons E.P., Fowler A.A., Hyers M.T., Henson M.P. (1985). Chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis* 132: 490

- 66) Pinkerton K.E., Brody A.R., Mc Laurin D.A. et al. (1983). Caracterización de three types of chrysotile asbestos after aerosolization. *Environ Res* 31
- 67) Plan Nacional de Saneamiento Atmosférico. S.S.A. Subsecretaría de Mejoramiento del Ambiente. Dirección General de Saneamiento atmosférico. 1979
- 68) Robertson J., Caldwell R.J., Castleien R.J., Waldman H.R., (1976). Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions. *J Immunol* 117 (3): 900
- 69) Robbins A.R., Rasmussen K.J., Clayton E.M., Gossman L.G., Kendall J.T., Rennard I.S. (1978). Antigenic identification of chemotactic factor inactivator in normal human serum and bronchoalveolar lavage fluid. *J Lab Clin Med* 110 (3): 292
- 70) Reynolds Y.H., Newball H.H. (1974). Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab and Clin Med* 84 (1): 559
- 71) Saint-Remy R.M.J., Cole P. (1980). Interactions of chrysotile asbestos fibres with the complement system. *Immunology* 41: 431
- 72) Sibille Y., Naegel P.G., Merrill W.W., Young R.K. Jr., Care B.S., Reynolds Y.H. (1987). Neutrophil chemotactic activity produced by normal and activated human bronchoalveolar lavage cells. *J Lab Clin Med* 110 (5): 624
- 73) Sirosis P., Drapeu G., Regin R. (1983). Biochemical components of bronchoalveolar lavage in early experimental asbestosis of the sheep: Phospholipase A2 activity, prostaglandin E2 and proteins. *Environ Health Perspect* 51: 293
- 74) Shaw O.J., Henson M.P., Henson J., AIMLT., Webster O.R. (1980). Lung inflammation induced by complement derives chemotactic fragments in the alveolus. *Lab Invest* 42 (5): 547
- 75) Snyderman R. (1981). Chemotaxis of human and murine mononuclear phagocytes. En: Adams O., Edelson J.P., Karen H. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. Academic Press pp: 1023.
- 76) Spurzen R.J., Saltini C., Rom W., Winchester J.R., Crystal G.R. (1987). Mechanisms of macrophage accumulation in the lungs of asbestos-exposed subjects. *Am Rev Resp Dis* 136: 276
- 77) Stanton F.M., Layard M., Tegeris A., Miller E., May M., Morgan E., Smith A. (1981). Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestosis and other fibrous minerals. *J Nat Cancer Instit* 67 (5): 965

- 78) Stimler P.N., Hugli E.T., Bloor M.C. (1980). Pulmonary injury induced by C3a and C5a anaphylatoxins. *Am J Pathol* 100: 327
- 79) Till O.G., Ward A.P. (1986). Systemic complement activation and acute lung injury. *Fed Proc* 45 (1): 13
- 80) Wadden A.R., Scheff A.P. (1987). Contaminación del aire en interiores. edit. Limusa. 1a. edición. México d.f. pp: 257
- 81) Waldbott L.G. (1976) Diseases due to air pollutants. *Clin Toxicol* 9 (6): 923
- 82) Warheit B.D., Hill H.L., Gerwyn G., Brody R.A. (1986). Time course of chemotactic factor generation and the corresponding macrophage response to asbestos inhalation. *Am Rev Resp Dis* 134: 128
- 83) Warheit B.D., Gerwyn G., Hill H.L., Snyderman R., Brody R.A. (1985). Inhaled asbestos activates a complement dependent chemoattractant for macrophages. *Lab Invest* 52 (5): 505
- 84) Weissmann G., Samuelsson B., Paoletti R. (1978). Advances in inflammation research. Vol. 1. Raven Press
- 85) Williams y Chace. Methods in immunology and immunochemistry. Cap 17 F4c. UM IV. Academic Press
- 86) Wilson R.M., Gaumer R.H., Salvaggio E.J. (1977). Activation of the alternative complement pathway and generation of chemotactic factors by asbestos. *J Allergy Clin Immunol* 60 (4): 218
- 87) Worthen S.G., Haslett C., Smedly A., L., Rees J.A., Gumbay S.R., Henson E.J., Henson M.P. (1986). Lung vascular injury induced by chemotactic factors enhancement by bacterial endotoxins. *Fed Proc* 45 (1): 7
- 88) Xaubet A., Rodriguez-Roisin R., Bombi A.J., Marin A., Roca J., Agusti-Vidal A. (1986). Correlation of bronchoalveolar lavage and clinical and functional findings in asbestosis. *Amer Rev Resp Dis* 133: 848
- 89) Yano, E., Takeuchi A., Akira Koizumi S.N., Poole A., Brown C.R., Johnson F.U., Evans H.R., Yukigama Y. (1985). In vitro biological effects of volcanic ash from mount Sakurayima. *J Toxicol Environ Health* 16: 127
- 90) Ziskind M., Jones R.N., Weil H. (1976) Silicosis. Stat of the art. *Am Rev Resp Dis* 113: 643