11281

15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACION DE BIOMARCADORES DE DAÑO RESPIRATORIO EN HABITANTES DE LA CIUDAD DE MEXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

DIRECTORA DE TESIS

DOCTORA PATRICIA OSTROSKY SHEJET

Facultad de Medicina

MEXICO, D.F. 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACION DE BIOMARCADORES DE DAÑO RESPIRATORIO EN HABITANTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA
TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

DIRECTORA DE TESIS
DOCTORA PATRICIA OSTROSKY SHEJET

COMITÉ TUTORAL
DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

MEXICO D.F. 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SINODALES
DR. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA
DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
DR. JULIO EVERARDO SOTELO MORALES
DR. RAUL HUMBERTO SANSORES MARTINEZ
DR. SILVESTRE FRENK Y FREUND

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El esfuerzo que no se ve en este trabajo y los tiempos robados y las noches largas y demás son para mis hijas, **Alejandra y Tere**. Para ellas que ahí estaban y están apoyándome.
Para ti y contigo, en las buenas y en las malas, con mucho, mucho cariño, **hermanita querida**.
Ma, sin ti no hubiera llegado hasta aquí, ¡gracias!
Para quien empujó y empujó y no bajó la guardia y me persiguió y no me dejó cuando pensé que ya no... mi muy querida **POS** (Rose). Hiciste de este proyecto una etapa muy divertida, ¡tenkiu!
Margarita, la amiga y la colaboradora que siempre tiene "la palabra justa" en el momento indicado" y la sonrisa que anima...
Emilio y Mahara, no es posible en caracteres agradecer su apoyo en todo momento... ¡gracias!

POW ¿y si no me hubieras empujado? No tendrías éste, tu otro doctorado, ¡Gracias!

Agradecimientos

Hay tantas personas a las que agradecer por diferentes causas...
Irma, Ivonne por su apoyo y cariño
Mary Carmen López por su apoyo y paciencia para enseñarme a hacer y leer cometas
A mi equipo de trabajo: Lauris, Sandra, Patty B, Adriana, Geraldine y a la nueva integrante Patty M.
A Paco, Victor, Mabel y Vero por su apoyo técnico y afecto
A Silvia Resendiz, Patty Roa e Yrene Vielma por su paciencia
A los estudiantes de Medicina que fueron la base para realizar este trabajo
A mí muy querida Facultad de Medicina y a la UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

- **RESUMEN** I
- **ABSTRACT** III
- **LA CONTAMINACION ATMOSFERICA** 4
- **LOS CONTAMINANTES CRITERIO** 5
- **EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES CRITERIO EN LA SALUD:**
  - OXIDOS DE NITRÓGENO 6
  - DIOXIDO DE AZUFRE 7
  - PARTICULAS SUSPENDIDAS TOTALES 7
  - MONÓXIDO DE CARBONO 8
  - OZONO 9
- **EFECTOS EN LA SALUD Y EXPOSICION A OZONO:**
  - EFECTOS AGUDOS 11
  - EFECTOS CRÓNICOS 13
- **CANCER COMO CONSECUENCIA DE LA EXPOSICION A LOS CONTAMINANTES** 14
- **EL HABITO TABAQUICO COMO MODELO** 15
- **LA NARIZ COMO ORGANO FILTRADOR** 17
- **OTRAS VARIABLES QUE PUENDEN INFLUIR EN LA RESPUESTA A LOS CONTAMINANTES ATMOSFERICOS:**
  - ESTRÉS OXIDATIVO 23
  - LOS RADICALES LIBRES Y EL ADN 30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ASMA E INFLAMACION 30

- LA INFLUENCIA DEL GENERO 32

- **LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN LA SALUD** 33
- **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR** 33
- **BIOMARCADORES** 34
- **EXPOSICIÓN** 34
- **SUSCEPTIBILIDAD** 35
- **EFECTO** 35
- **LA ELECTROFORESIS UNICELULAR O ENSAYO COMETA** 36
- **JUSTIFICACIÓN** 37
- **OBJETIVO** 39
- **HIPOTESIS** 39
- **METODOLOGIA** 39
- **RESULTADOS** 43
- **DISCUSION** 48
- **CONCLUSIONES** 57

RESUMEN

La atmósfera de la Ciudad de México es una de las más contaminadas del mundo, por lo que es necesario evaluar los efectos de la misma en la salud humana, con el objeto de caracterizar adecuadamente las alteraciones y así, tomar decisiones adecuadas de riesgo-beneficio. Desde hace varios años, nuestro grupo ha estudiado los efectos de los diversos contaminantes en el sistema respiratorio. Los resultados en diversos grupos nos han permitido observar que el ozono altera la función respiratoria de los niños expuestos por varias horas a concentraciones por arriba de la Norma Mexicana para este contaminante. Además, aquellos residentes en la zona con mayor concentración de ozono – Suroeste - , reportaron una mayor sintomatología respiratoria comparada con los de una zona con menor concentración. Buscando un biomarcador que identificara la presencia de daño oxidativo, considerando que el ozono es altamente oxidante, utilizamos el ensayo "Cometa" o "Electroforesis Unicelular" que identifica los rompimientos en las cadenas del ADN y que se consideran como un marcador de daño genotóxico. Se utilizó el epitelio nasal, porque es el primer sitio de contacto con los contaminantes atmosféricos, y se llevó a cabo un estudio en alumnos de primer año de la carrera de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se aplicó un cuestionario para identificar antecedentes de patología respiratoria previa y al momento del estudio. Se realizo en cada caso: espirometría, citología nasal, electroforesis unicelular en células del epitelio nasal y en leucocitos en sangre periférica. La población total se dividió de acuerdo con las variables que resultaron de interés. Cuando se tomó el

antecedente de asma como variable, se hizo evidente que este grupo tenía un mayor daño genotóxico, en el epitelio nasal pero no así en los leucocitos de sangre periférica. Estas diferencias suponemos pueden ser consecuencia del proceso inflamatorio crónico, que en el caso de los asmáticos tiene al eosinófilo como parte importante de la fisiopatología de esta enfermedad, célula con un gran potencial oxidante y que al ubicarse en el epitelio respiratorio, aunado al daño ocasionado por la contaminación, potencia el daño genotóxico en el epitelio nasal. Tomando la variable género, encontramos que en los estudiantes del sexo masculino la alteración en el ADN del epitelio nasal fue significativamente mayor que en las alumnas. Consideramos que el efecto antioxidante y anti-inflamatorio de los estrógenos, pudiera estar dando una mayor protección en el caso de las mujeres. De manera general, la presencia de metaplasma escamosa fue más frecuente en la zona con mayor exposición a ozono – el suroeste- que en los residentes en el norte de la Ciudad de México.

Es de relevancia el seguimiento de estas poblaciones expuestas de manera continua a contaminantes atmosféricos, como el caso de nuestra población, y plantear posibilidades para mitigar el efecto que éste y otros contaminantes están teniendo en la población.

ABSTRACT

Atmospheric pollution is a worldwide problem and several diseases are related with it.In previous works we mentioned modifications in children's respiratory function.

Asthma is a chronic inflammatory respiratory disease with an increasing prevalence worldwide, there are several hypotheses about this, and one of them is the enhanced exposure to air pollutants.The chronic inflammation is also related with the generation of oxidative stress since the cells involved in the allergic reaction are capable of producing reactive oxygen species and,this might predispose asthmatics to increased genotoxic damage.We found that there were more asthmatic subjects and higher ozone levels in the South area of the City(60%).For the estimation of genotoxicity,we applied the SCGE assay in two different cell types(nasal epithelial cells and leukocytes)and found that the asthmatics had higher DNA damage in the nasal epithelial cells.In contrast, asthmatic's leukocytes showed less damage than the non-asthmatics, probably suggesting hyperreactivity of the nasal epithelium which prevents systemic pollutant effects, reflected in less DNA injure. We also evaluated gender differnces and found higher genotoxicity in male subjects.These results suggest that asthmatic's nasal epithelial cells and male subjects are more sensitive to genotoxic damage,either by air pollution or chronic inflammatory response, which might induce cell changes that could result in disfunctional and/or morphological alterations.

LA CONTAMINACION ATMOSFERICA

La contaminación atmosférica en la Ciudad de México se ha convertido en un problema de salud pública desde hace más de una década. Múltiples intentos de controlarla se vienen realizando por parte del gobierno de la Ciudad de México en conjunto con las autoridades correspondientes del Estado de México. La desaparición de los límites entre ambas entidades ha llevado a considerar el problema de la contaminación como un todo englobado en lo que actualmente se conoce como la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM).

Hay que recordar que uno de los grandes problemas de la ZMVM es su ubicación geográfica y sus características meteorológicas y la gran concentración humana en un área muy pequeña. La Ciudad de México es una cuenca endorreica, muy elevada situada a 2240 msnm en el sur y 2390 msnm en el Norte, rodeada por montañas con una altura promedio de 3000 m en el Sur y de 2800 m en el Norte. Su limite en el Sur son las sierras Chichinautzin y del Ajusco; por el suroeste se continúan las sierras de Las Cruces, Monte Alto y Monte Bajo; mientras que en el noroeste se define por las sierras de Tepotzotlan y de Tezontlalpan; cerrando el limite norte la Sierra de Pachuca; por el noroeste se encuentra marcando el limite la Sierra de Chichicuaultla y al este las de Teozan y Calpulalpan, continuándose ésta ultima con la Sierra de Río Frió y la Sierra Nevada, misma que cierra la cuenca[6].

En cuanto a su clima, se puede dividir en dos estaciones, una de secas –de noviembre a abril y la de lluvias de mayo a octubre. El régimen de vientos es: Una corriente del oeste que prevalece de abril a noviembre que se caracteriza por un flujo anticiclónico y cielos despejados, y una corriente de vientos húmedos asociada a la época de lluvias. Los vientos en general son de baja intensidad, lo que dificulta la movilización de contaminantes. La dirección de los mismos es de norte a sur y la industria se encuentra ubicada en el norte de la ciudad, lo que permite un arrastre de los contaminantes de norte a sur.[6]

Se han llevado a cabo varios intentos para reducir el problema de la contaminación, lo que se refleja en una baja en los días de contingencia ambiental, pero no se ha notado una baja en el número de días en que estamos por arriba de la Norma Mexicana de Calidad del Aire para Ozono.

Las normas de calidad del aire aparecieron por primera vez en 1982 emitidas por la Secretaria de Salubridad y Asistencia, y han sido modificadas para aplicar actualmente las emitidas en 1994. Estas toman en cuenta a los contaminantes llamados "criterio" que son los internacionalmente aceptados para proteger la salud de la población [1].

LOS CONTAMINANTES CRITERIO

Los contaminantes criterio que son supervisados regularmente por la Red de Monitoreo Ambiental (RAMA), son: Monóxido de Carbono (CO), Óxidos de

Nitrógeno (NOx), Óxidos de Azufre (SOx), Partículas Suspendidas Totales (PST), Partículas Suspendidas de 10μm (PM10) y Ozono (O_3).[1]

EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES CRITERIO EN LA SALUD

OXIDOS DE NITRÓGENO (NOx)

Estos compuestos se encuentran habitualmente en mayor concentración intramuros y se asocian al uso de estufas de gas y calentadores de queroseno. Su concentración extramuros tiene una relación importante con la formación de ozono troposférico. Es menos reactivo que el ozono y por su baja solubilidad en la superficie líquida del epitelio de las vías respiratorias altas, llega profundamente al ser inhalado hasta las regiones periféricas pulmonares, sitio en el que más del 60% se deposita. Sus mecanismos de daño son muy semejantes a los del ozono, y se describen mas adelante. En el caso de escolares se reporta que en aquellos que residen en casas con uso de estufa de gas y en las que las concentraciones intramuros son muy elevadas, el riesgo de que estos niños presenten infecciones en vías respiratorias bajas se eleva notablemente [(7)]. La Norma Mexicana de Calidad del Aire para este gas es 0.21ppm una hora una vez al año [(2)].

---

[1] Comisión Nacional de Derechos Humanos. La Contaminación Atmosférica en México. Sus causas y efectos en la Salud. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México DF. 1992.

[2] Estadísticas del Medio Ambiente Natural, Asentamientos y actividades humanas. Cáp. III. en Estadísticas del Medio Ambiente. Inst. Nacional de Geografía, 1998.p122.

DIOXIDO DE AZUFRE (SO_2)

El azufre es un contaminante natural en los combustibles fósiles y en consecuencia la quema de carbón y derivados del petróleo, liberará SO_2 a la atmósfera. Cuando este gas es transportado en el aire, es oxidado a ácido Sulfúrico. Este gas es altamente irritante y al entrar en contacto con la humedad de la mucosa nasal lleva a la liberación de Hidrógeno, bisulfito o iones de sulfito. Destruyen el epitelio nasal y de la traquea produciendo cuadros parecidos a la bronquitis. La exposición repetida en presencia de un antígeno puede inducir hipersensibilidad bronquial. Disminuye la actividad ciliar lo que altera el transporte de materiales a través del tracto respiratorio. En el caso de los asmáticos se hacen más hiperreactores al entrar en contacto con este gas[7]. La Norma Mexicana para este gas es de 0,13 ppm una hora una vez al año[2].

PARTICULAS SUSPENDIDAS TOTALES (PST)

Las partículas suspendidas totales son una mezcla de componentes sólidos y líquidos suspendidos en el aire y éstas varían en composición y tamaño. Las que pueden alterar la salud son las que tienen un diámetro menor o igual a 10μm (PM_{10}) y recientemente hay una gran preocupación por las partículas con un diámetro menor o igual a 2.5μm[7] ($PM_{2.5}$), ya que un aumento en su concentración, cuando éstas son producto de la quema de combustibles fósiles, se ha asociado a un aumento en la mortalidad de la población, un aumento de 10μm/m^3 en $PM_{2.5}$

da como resultado un aumento en la mortalidad diaria de 3.4%[3]. La Norma Mexicana para PST es de 260μm/m^3, una vez al año, con una media aritmética anual de 75μm/m^3. Para PM_{10} es de 150μm/m^3, una vez al año, con una media aritmética anual de 50μm/m^3. (2)

Recientemente se realizó un estudio en colaboración con un grupo canadiense, en donde se comparó la concentración de partículas en tejido pulmonar de mujeres mexicanas y canadienses no fumadoras, encontrando una enorme diferencia entre ambas poblaciones, ya que se detectó una gran cantidad de partículas en el tejido de las mujeres mexicanas, producto de la combustión de productos derivados del petróleo y otros materiales. Ambas poblaciones sin antecedentes de patología respiratoria ni de hábito tabáquico (4).

MONOXIDO DE CARBONO (CO)

El contacto con este gas tiene como consecuencia un aumento en la formación de carboxi-hemoglobina, que en grupos humanos de riesgo, como es el caso de los pacientes con enfermedad obstructiva crónica, agravará la hipoxemia ya existente, situación que también tiene repercusiones severas en los individuos con enfermedad isquémica miocárdica. Se menciona que el CO puede tener relación con el desarrollo de ateroesclerosis (7).

---

[3] Laden F, Neas ML, Dockery WD, and Schwartz J. Association of fine particle matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. Environ Health Persp 2000; 108:941-947.

[4] Brauer M, Avila-Casado MC, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A. Air pollution and retained particles in the lung. Environ Health Persp 2001; 109:1039-1043

OZONO (O_3)

Como un agente altamente oxidante, el O_3 es capaz de reaccionar con una gran variedad de biomoléculas intra y extracelulares, principalmente con aquellas que tienen grupos tioles o uniones no saturadas C=C. Interactúa con varias enzimas del metabolismo intermedio, el reciclamiento de glutatión, metabolismo de xenobióticos y la función de anti-proteinasas. También actúa *in vivo* e *in vitro,* reacciona con el glutatión, el ascorbato y el ácido úrico., que se encuentran en la capa líquida que cubre al epitelio respiratorio, y que pueden funcionar como amortiguadores de la acción del ozono sobre el epitelio. Este gas es un contaminante secundario producto de la interacción entre los óxidos de nitrógeno, los Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y la radiación solar. La ZMVM, por su ubicación geográfica, que presenta una gran insolación a lo largo de todo el año, favorece la formación de este gas. Este gas es uno de tantos agentes oxidantes que se forman en la atmósfera, pero al ser el mas fácil de medir, se ha adoptado como un contaminante "típico" de este grupo de gases. Una característica importante de estos, es que no son emitidos directamente a la atmósfera, sino que se forman a través de complicadas reacciones fotoquímicas.

El Ozono existe naturalmente en la atmósfera en concentraciones de 0.05ppm en áreas rurales. En áreas urbanas estas concentraciones varían, y pueden ir por arriba de la norma que es 0.11 ppm.

Desde los años 70s el uso de combustibles típicamente industriales como el combustoleo y el diesel, mas el continuo aumento del consumo de gasolina,

permitió un aumento de precursores de ozono en la atmósfera. En la ecuación de la formación de ozono, en el caso de la atmósfera de la ZMVM la concentración de óxidos de nitrógeno (NOx) es determinante en la formación del ozono. Ya en 1987, se informaba del aumento súbito en la concentración de este gas en la atmósfera y se consideró que esto se debió al cambio en la composición de las gasolinas producidas por PEMEX, que se introdujeron para bajar la concentración de plomo en las mismas. Estas gasolinas han sido modificadas hasta tener la formulación actual.

El ozono tiene un ciclo diario relacionado con las emisiones y la insolación, aumentando de las 9:00 a.m. a las 13:00 hrs. en las que llega habitualmente a su mayor concentración, para bajar lentamente hasta las 17:00 hrs. Habitualmente el sitio en el que se reportan las concentraciones más elevadas de ozono es en el Suroeste, esto como consecuencia de la distribución de las corrientes de aire que cruzan la ciudad de Norte a Sur, arrastrando todos los contaminantes generados en el Norte de la Ciudad y llevándolos por el Centro y Suroeste de la Ciudad[5]. En esta zona es donde se inician habitualmente las contingencias ambientales por este contaminante y sitio en el que se han reportado las concentraciones por hora más altas. Con estos antecedentes la zona SO se consideró un sitio idóneo para identificar los efectos que el ozono pudiera ocasionar en la salud de la población.[6]

---

[5] Programa para mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000. Departamento del Distrito Federal, Gobierno del Edo. de México, Secretaria del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca y Secretaria de Salud, México. 1996.pp. 47-53.

[6] Rivero S, Ponciano RG y Fortoul T. Contaminación Atmosférica y Enfermedad Respiratoria. Biblioteca de la Salid, México, Fondo de Cultura Económica, 1993.

EFECTOS EN LA SALUD Y EXPOSICION A OZONO

Los efectos a la salud como consecuencia de la exposición a este gas se pueden dividir en agudos y crónicos. La mayor parte de los estudios que hay en humanos son en exposiciones agudas.

EFECTOS AGUDOS

En humanos se han descrito las siguientes alteraciones, en exposiciones agudas[7]:

- Tos irritativa y dolor retroesternal inspiratorio.
- Disminución de la Capacidad Vital forzada y del Volumen espiratorio forzado del 1er segundo, dado principalmente por una disminución en la capacidad inspiratoria. En estudios por exposición voluntaria, se ha visto que hay una gran variabilidad en la respuesta individual.
- Aumento en los ingresos a Unidades de urgencias de pacientes asmáticos y con enfermedades pulmonares crónicas.
- Migración de gran cantidad de neutrófilos en la submucosa bronquial y un aumento de proteínas y mediadores inflamatorios en el lavado bronquiolo-alveolar.
- En exposiciones repetidas se refiere que puede haber una modificación en algunos indicadores de inflamación, algunos aún estarán y otros

[7] Health effects of outdoor air pollution. State of Art. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:3-55.

disminuirán independientemente de los resultados de "adaptación" de los estudios de función respiratoria[8].

En animales[4,7]:

- Se confirmaron los cambios apreciados en humanos y en cuanto a la inflamación esta se extiende a todo el tracto respiratorio.
- Los cambios son mayores en la zona subepitelial. Las células ciliadas son más sensibles que las células de Clara y los neumocitos I más que los de tipo II. Se menciona también, en ratones, un aumento en la susceptibilidad a presentar infecciones bacterianas.
- En animales se ha observado que exposiciones subsecuentes a este gas ocasiona adaptación y tolerancia para los cambios funcionales, pero no en cuanto al proceso inflamatorio y los cambios morfológicos que estén ocurriendo[7].
- Aumento en la susceptibilidad para contraer infecciones, al parecer por una modificación en la función del macrófago pulmonar.
- Se refiere también una susceptibilidad especial de los linfocitos T a la acción del ozono.

[8] Jorres RA, Holz O, Zachgo W, Timm P, Koschyk S, Muller b, Grimminger F, Seeger W, Kelly JF, Dunster Ch, Frischer T, Lubec G, Waschewski M, Niendorf A, and Magnussen H. The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchioalveolar lavage fluid and mucosal biopsies.
Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1855-1861.

EFECTOS CRÓNICOS

ESTUDIOS EN HUMANOS

Algunos estudios en este apartado se relacionan con las modificaciones que en el largo plazo se asocian a la exposición a diversos contaminantes y en especial al ozono. Loomis y cols[(9)] , refirieron que un aumento de 100 ppm en la concentración máxima de ozono se asocia a un aumento en la mortalidad total de 1.029%[9]. Otro estudio en la población de niños en la ZMVM menciona que hay un aumento en el ausentismo escolar asociado a concentraciones elevadas de ozono[10]. Castillejos y cols[11], publicaron un estudio en estudiantes de Primaria de una zona del Sur de la Ciudad que reporta solo una ligera modificación en las pruebas funcionales respiratorias y persistencia de sintomatología respiratoria.

Estudios realizados en Los Ángeles, Cal. USA refieren una disminución de la Capacidad Vital Forzada y el lavado de nitrógeno - estudio que consiste en evaluar el remante de este gas después de su inhalación- , en todas las edades, datos que sugieren alteraciones bronquiolares, y que se han confirmado en animales[4,7].

Por otro lado, en una revisión sobre el efecto genotóxico del ozono[12] no se reportaron datos en humanos.

---

[9] Loomis PD, Borja.Aburto VH, Bangdiwala IS and Shy MC. Ozono exposure and daily mortality in Mexico City: A time -series analysis. Health Effects Inst Res Report 1996; 75:1-45.

[10] Romieu I, Lugo MC, Velasco SR, Sanchez S, Hernandez M. Air pollution and school abscentism among children in Mexico City. Am J Epidemiol 1992; 136:1541-31.

[11] Castillejos M, Glod RM, Dockery D, Tostenson T, Baum T and Speizer EF. Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in México City Schoolchildren. Amer Rev Respir Dis 1992; 145:276-282.

[12] Victorin K. Review of the genotoxicity of ozone. Mutation Res 1992; 277:221-238.

ESTUDIOS EN ANIMALES

En monos se observó que la exposición intermitente a ozono producía mayor o igual daño bronquial que en los animales expuestos continuamente a ozono. Se refiere una "bronquiolización" de las porciones alveolares. En ratas expuestas continuamente por un año a ozono, se apreció una ligera hiperinflación, que fue reversible después de suspender la exposición, y al ser evaluados nuevamente 6 meses después.

Otro cambio que se ha referido es el daño al ADN, ocasionando rompimientos en sus cadenas. Estos, detectados en macrófagos alveolares de ratas expuestas[13]. Una revisión sobre la genotoxicidad del ozono muestra datos de este efecto en plantas y animales. En un estudio en animales expuestos se refiere un aumento en la aparición de adenomas pulmonares.

La gran preocupación por la exposición a los contaminantes atmosféricos es debida a la alta incidencia de enfermedades degenerativas como es el caso de las enfermedades pulmonares obstructivas y el cáncer, en especial el pulmonar, que se reporta con mayor frecuencia en aquellos países en los que la contaminación atmosférica es un problema ambiental.

CANCER COMO CONSECUENCIA DE LA EXPOSICION A LOS CONTAMINANTES

La mortalidad por neoplasias incluidas leucemias, en el País, ocupa el sexto lugar en la mortalidad total, y en el Distrito Federal el segundo, igual que en Nuevo León

[13] Bermudez E, Femg S-F, Castro CE, and Mustafa MG. DNA strand breaks caused by exposure to ozone and nitrogen dioxide. Environ Hlth Persp 1999; 81:72-80.

y Jalisco[1,12]. Estos estados se caracterizan por presentar problemas de contaminación atmosférica desde hace varios años. Dos reportes en población mexicana, mencionan un aumento en la prevalencia de cáncer pulmonar. Uno de estos reportes refiere una disminución en la edad de aparición de cáncer pulmonar, en sujetos no fumadores y residentes de zonas urbanas[14]. El otro estudio refiere un aumento en la mortalidad por cáncer pulmonar asociado al hábito tabáquico, pero considerando también la posibilidad de la participación de la contaminación ambiental para el desarrollo de esta alteración[15]. Mas recientemente se refiere un aumento en la mortalidad por neoplasias malignas de la cavidad y de los senos paranasales en la Cd. de México y en la de Monterrey, que como ya se mencionó tienen problemas de contaminación ambiental[16]. En otros países con elevada contaminación atmosférica, hay referencias de la posible asociación con cáncer pulmonar[17] .

EL HABITO TABAQUICO COMO MODELO.

De los modelos de exposición en humanos en los cuales hay todo tipo de evidencia del desarrollo de cáncer, el tabaco es una de ellas. Desde el estudio de

---

[14] Green LS, Fortoul TI, Ponciano G, Robles C and Rivero SO. Bronchogenic cancer in patients under 40 years old. CHEST 1993; 104:1477-81.

[15] Lazcano PE, Tovar GV, Meneses GF, Rascon PRA, and Hernández AM. Trends in lung cancer mortality in Mexico. Arch Medical Res 1997; 28:565-570.

[16] Calderon-Garcidueñas L, delgado R, Calderon-Garcidueñas A, Meneses A, Ruiz LM, De la Garza J, Acuña H, Villarreal-Calderon A, Raab N, and Devlin R. Malignant neoplasms of the nasal cavity and paranasal sinuses: A series of 256 patients in Mexico City and Monterrey. Is air pollution the missing link? Otolaryngology-Head and neck Surgery 2000; 122:499-508.

[17] Jedrychowsky W. Interaction of smoking and urban air pollution in the aetiology of lung cancer. Neoplasma 1983; 30:603-609.

Doll y Petto[18] que dio evidencia suficiente para esta asociación, muchos han sido los estudios que han confirmado que el fumar aumenta el riesgo desarrollar cáncer pulmonar. El tabaco al entrar en combustión genera miles de compuestos que pueden ocasionar cambios celulares que llevan a la metaplasia y posteriormente a displasias severas con francos cambios neoplásicos[19] [20]. Se considera ahora que una de las acciones que ocurre por la combustión e interacción de los productos del humo del tabaco con el epitelio respiratorio, es el daño ocasionado por la producción de radicales libres que producirán cambios celulares que pueden alterar la estructura del ADN. Esta misma situación se ha propuesto para las alteraciones observadas por la exposición a ozono[21].

Como se menciona en los párrafos anteriores, un sitio de daño para los contaminantes ambientales es la nariz. Sitio por el que entra de 12 a 14 veces por minuto el volumen corriente que permite la ventilación y la difusión del oxígeno y el dióxido de carbono. Su función mas conocida es la de filtro, pero también se le reconoce una actividad metabólica de sustancias xenobióticas, como se describe a continuación.

---

[18] Doll R and Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. JNCI 1981; 66:1192-1308.

[19] The Health benefits of Smoking Cessation. A report of the Surgeon General. Rockville, Maryland. CDC 1990.

[20] Harris CC, Willey CJ, Saladino JA, Grafstrom CR. Effects of tumor promoters, aldehydes, peroxides and tobacco smoke condensate on growth and differentiation of cultured normal and transformed human bronchial cells. Carcinogenesis 1985; 8:159-171.

[21] Galizia A and Kinney PL. Long-term residence in areas of high ozone: Associations with respiratory health in nationwide sample of nonsmoking young adults. Environ Hlth Persp 1999; 107:675-679.

La Nariz como órgano filtrador

La nariz es la puerta de entrada del aire que respiramos y además el punto inicial de daño por todos aquellos compuestos que se encuentren suspendidos en el aire.

Su función es modificar las condiciones del aire que llega a ella para que al alcanzar las vías respiratorias bajas, ya esté atemperado, filtrado y humectado. En el caso de la presencia de algún contaminante en el aire, diluye la concentración del mismo antes de que ingrese a las vías respiratorias bajas.

El volumen calculado de la cavidad nasal en el ser humano es aproximadamente de 25 cm^3 con una superficie de exposición calculada en 18,100 mm^2 y la relación área/ volumen es de 820 mm^2/cm^3 (ver Figura 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

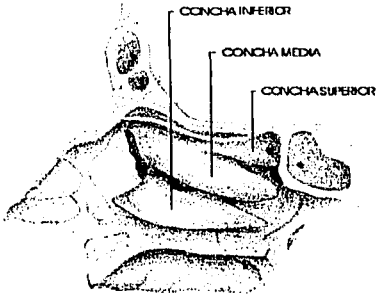


Figura 1 Corte sagital del cráneo nos permite observar la estructura de la cavidad nasal en la que se aprecian los tres cornetes o conchas, sitios cubiertos con epitelio respiratorio rico en enzimas del grupo de la mono-oxidasas que metabolizan xenobióticos.

Epitelios que la cubren

El epitelio respiratorio que cubre a la cavidad nasal esta constituido por células basales, mucoproductoras, ciliadas y de gránulos pequeños. Ante una agresión este epitelio cambia su estructura sufriendo metaplasia epidermoide, serosa o

mucoide; este epitelio que tiene un recambio mucho menor que en condiciones normales (Figura 2).

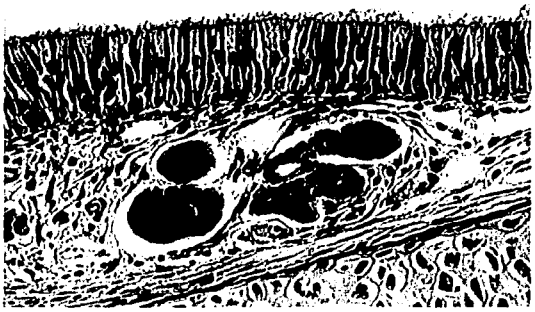


Figura 2. Epitelio respiratorio en el que se aprecian células ciliadas, algunas mucoproductoras, células basales y olfatorias y glándulas submucosas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto al tiempo de recambio del epitelio en condiciones normales, varía de acuerdo con la especie analizada. En la rata va de 24 a 41 días. Después del daño por un cepillado se reporta que puede ir de algunos días – en cabra, pollos o ratas – y hasta varios meses en el caso del humano. Cuando se identifica el daño por la frecuencia de división de las células que integran el epitelio, ésta es variable, es decir, a las 24 horas se observan las primeras mitosis y la ciliogénesis y mucinogénesis se ve hasta a las 60 horas.[22]

De manera general el tercio anterior de la cavidad nasal está revestido de epitelio escamoso, mientras que el resto de la misma está cubierta por epitelio respiratorio. En lo que corresponde al techo de la cavidad nasal encontramos al

[22] Bang BF and Bang GB. Mucous membrane injury and repair. In Respiratory Defense mechanisms Pt I. ed. Brain DJ, Proctor FD and Reid ML. New York, Marcel-Dekker. Pp. 453-488.

epitelio olfatorio que tiene características diferentes y ocupa aproximadamente 500 mm^2. Este epitelio incluye: células olfatorias – que son neuronas bipolares-, basales y sustentaculares. Estas células están soportadas en una membrana basal en la que se ubican las glándulas de Bowman que secretan un material seroso[23].

Se ha identificado que algunas de las células que constituyen el epitelio respiratorio de la cavidad nasal presentan gran cantidad de enzimas que tienen relación con el metabolismo de xenobióticos[24]. Se ha detectado también la presencia de carboxilestearasas, principalmente en las células ciliadas, cuboides y sustentaculares, y en mayor cantidad en las glándulas de Bowman[25]. Esta actividad enzimática puede modificarse al contacto con el humo del tabaco y disminuye en los casos de hiperplasia o metaplasia del epitelio.

Los cambios inducidos por las agresiones son de tres tipos[26]:

- Proceso Destructivo: La consecuencia última de la inflamación es la formación de radicales libres que son altamente agresivos para el tejido. Se dañan las uniones intercelulares y esto permite el paso de líquido, macromoléculas y células inflamatorias; además pasan agentes tóxicos y hay daño de los hemidesmosomas y de la membrana basal, lo que favorece la descamación de las células del epitelio.

---

[23] Gartner PL y Hiatt LJ. Texto Atlas de Histología. 2da ed. Mexico, McGrawHill.2002.pp. 329-334

[24] Hakerma RJ Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ Health Persp 1990; 85:231-238.

[25] Bogdanffy SM, Randall WH and Morgan TK. Biochemical quantification and histochemical localization of carboxylesterase in the nasal passages of the Fischer-344 rat and B6C3F1 mouse. Toxicology and Appl. Pharmacology 1987; 88:183-194.

[26] Chretien J, Nebut M. Environmental injuries in the airways. Cap 1. en Environmental Impact on The Airways. From injury to repair. Ed Chretien J, Dusser D. Lung Biology in Health and Disease. Vol. 93. New York Marcerl Dekker, 1996. pp1-18.

- Proceso Proliferativo: El epitelio se aprecia engrosado y con muchas capas celulares. Hay proliferación de las células serosas, así como la presencia de un exudado fibrinoso. Hay edema, los ductos de las glándulas se aprecian dilatados y hay gran cantidad de células inflamatorias que migran al sitio.
- Proceso metaplásico: Este se caracteriza por la sustitución, en un cierto lugar del epitelio normal por otro diferente – metaplasia escamosa -. Esta sustitución puede ser por un epitelio totalmente diferente o por el aumento de un solo tipo celular propio del sitio –metaplasia mucoide, de células basales etc. - (Figuras reparación 3 y 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

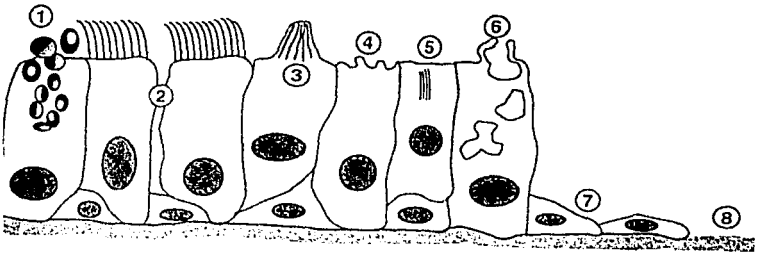


Figura 3 Representación de los diferentes patrones de daño del epitelio respiratorio y la gravedad cronológica de las lesiones. (1) Liberación de moco (2) Pérdida de la integridad de las uniones herméticas (3) cilios compuestos (4) pérdidas de cilios (5) pérdida de la polaridad celular (6) vacuolización (7) desprendimiento de las células epiteliales (8) denudación de la membrana basal.

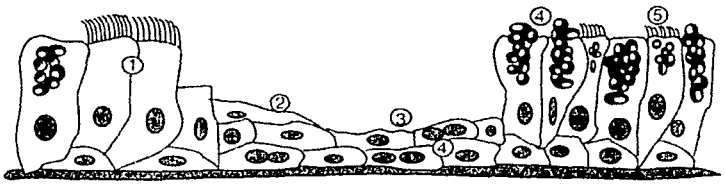


Figura 4 Tipos histológicos de las células que integran la superficie del epitelio respiratorio: (1) Reparación de las uniones herméticas (2) migración celular (3) Diferenciación premitotica hacia metaplasia escamosa (4) Hiperplasia de células basales y mucoproductoras (5) Rediferenciación postmitotica con el cambio de células mucosas a ciliadas.

PROCESO CELULAR DE REPARACIÓN[27]

Como respuesta a las agresiones se puede identificar una secuencia de eventos: reestablecimiento de la funcionalidad de la barrera, migración, proliferación y cambio del fenotipo celular. La adaptación puede presentarse como otro proceso de reparación en respuesta a un proceso crónico.

- **Reestablecimiento de la función de barrera.-** Estudios en traquea demuestran que la muerte de las células superficiales lleva al aplanamiento de la células basales para cubrir la lámina basal denudada. A las 6 horas ya se pueden identificar puntos de contacto entre las células. Se regeneran las uniones herméticas y a las 12 horas ya hay un cierto reestablecimiento de la permeabilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

[27] Puchelle E, Zahm Jean-Marie. Repair processes of the Airway Epithelium. Cap 7. Ed Chretien J, Dusser D. Lung Biology in Health and Disease. Vol. 93. New York Marcerl Dekker, 1996. pp157-182

- **Dinámica de reparación del epitelio.-** Las células que rodean el área lesionada migran hacia el centro a una velocidad inicial de 26 µm/hr. Posteriormente las capas superficiales del epitelio migran como una capa completa, hecho muy importante en la reparación, ya que esto lleva a la reparación de la zona desnuda en 6 u 8 horas.
- **Plasticidad y proliferación.-** 26 a 36 horas después de la agresión, el epitelio respiratorio que habitualmente tiene un índice mitótico muy bajo, (7-8%), llega hasta un 41%. Esta replicación está dada principalmente por las células basales. Entre las 56 y 72 horas se aprecian células secretoras y para las 96 horas después de esta proliferación, se observan células ciliadas. Habitualmente, hay una hiperplasia de células mucosas y basales asociada con la remodelación del epitelio. Se menciona que ciertos genes favorecen la trasformación de células secretoras a células escamosas. El cambio hacia una metaplasia secretora ocurre, probablemente por genes que codifican para síntesis de moco. La metaplasia es reversible y los factores que determinan su permanencia aún no están totalmente determinados y ésta está relacionada con la severidad de la lesión.
- **Adaptación y reparación.-** Adaptación se define como el cambio morfológico y fisiológico que ocurre en el epitelio respiratorio como respuesta a una exposición continua y no letal a diversos agentes oxidantes, dando una mayor tolerancia al agente inhalado. Parece que uno de los cambios que ocurren es un aumento en las uniones herméticas

intercelulares, engrosamiento de la mucosa y cambios en la composición del moco. Reportes de exposición a SO_2, indican el cambio de un moco neutral o básico a uno más ácido que es más resistente. Estudios de adaptación a la exposición a ozono refieren cambios que incluyen: necrosis celular, pérdida de cilios, aumento en la cantidad de células indiferenciadas y un alto índice mitótico; a los 60 días los cilios reaparecen. La recuperación completa se evidencia a los 40 días. Algunos de los cambios propuestos para que ocurriera la adaptación incluyen: Aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa citosólica y recambio epitelial, hasta llegar a un equilibrio entre la pérdida celular y la replicación celular; cambio en el fenotipo celular con la producción de material secretor alterado o síntesis de fluidos ricos en albúmina.

OTRAS VARIABLES QUE PUENDEN INFLUIR EN LA RESPUESTA A LOS CONTAMINANTES ATMOSFERICOS.

Estrés Oxidativo

Normalmente en los organismos sanos existe la producción de Especies Reactivas de Oxigeno (ROS) y de Nitrógeno (RNS); su actividad es balanceada por los mecanismos antioxidantes de defensa. Esta defensa no es del todo equilibrada y continuamente las moléculas dañadas como el ADN y las proteínas son reparadas o sustituidas.

El término Estrés Oxidativo se utiliza ampliamente en la literatura relacionada con

los radicales libres y se define como un "severo desbalance entre la producción de ROS/RNS y los mecanismos de defensa antioxidantes"[28].

¿Qué es un radical libre?

Es una molécula (orgánica o inorgánica) altamente reactiva que tiene un electrón no pareado, y que está involucrado en mecanismos químicos de toxicidad[29]. Los radicales libres, al poseer un número de electrones no pareados en su órbita externa, reaccionan fácilmente con las uniones insaturadas de los ácidos grasos de la membrana, desencadenando una serie de reacciones que causan peroxidación, y a la vez mayor producción de radicales libres que afectan a las células y tejidos vecinos[30].

Ahora bien, como ya se mencionó los radicales libres son productos normales del metabolismo aeróbico de la célula, las especies $O^{-}_{2}{}^{\bullet}$ y el $OH^{\bullet}$ son los radicales libres que con mayor frecuencia se encuentran en los organismos vivos. El H_2O_2 y el peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), aunque en sí no son radicales libres, contribuyen de forma importante al estado redox de la célula.

El $O^{-}_{2}{}^{\bullet}$ se forma por la salida de electrones (e^{-}) a través del transporte mitocondrial y por la unión de enzimas citosólicas y membranales incluyendo a la xantina oxidasa, el complejo citocromo P450 y la fosfolipasa A_2.

El H_2O_2 también se produce a través de la cadena de transporte mitocondrial de electrones (e^{-}), así como también a través de la auto-oxidación de pequeñas moléculas y por la dismutación del $O^{-}_{2}{}^{\bullet}$ mediante la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2, aunque por sí mismo no es reactivo, en presencia de

---

[28] Halliwell B and Gutteridge MC,2001). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Ed. India, Oxford University Press, pp 247-253.
[29] McCord, J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischaemic tissue injury. N. Engl. J. Med. 312:159-163.
[30] Freeman, B.A. y Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Investigation. 47: 412-426.

metales como el hierro o el cobre forma radicales hidroxilo que son altamente reactivos[24,25,31,32]:

$$O_2^{-\cdot} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}/Cu^{1+}} OH^{\cdot}$$

El $ONOO^{\cdot}$ se forma por la reacción del óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) con $O^{-}_2{}^{\cdot}$, la cual es una molécula altamente reactiva que forma $OH^{\cdot}$ [25]:

$$NO^{\cdot} + O_2^{-\cdot} \rightarrow ONOO^{-} + H^{+} \rightarrow ONOO \rightarrow OH^{\cdot} + NO_2^{\cdot}$$

En suma, los radicales libres provienen de tres fuentes diferentes: el organismo, el ambiente y las reacciones en cadena.

- El organismo: Este forma radicales libres en todo momento, ya que las células vivas necesitan energía para sus funciones básicas; dicha energía proviene de reacciones de óxido-reducción. Durante este proceso, se forman intermediarios del oxígeno, incluyendo los radicales superóxido e hidroxilo[33]. El ejercicio, las enfermedades y algunos medicamentos incrementan reacciones asociadas con el oxígeno, y consecuentemente aumenta la formación de radicales libres. Más aún, el sistema inmune produce radicales libres para destruir virus y bacterias. Los radicales libres son también importantes en la producción de hormonas y/o de mensajeros químicos en el organismo, por lo cual es importante aclarar que la producción de radicales libres no es del todo negativa. Sin embargo, el exceso y el descontrolado aumento de éstos produce un estado de estrés

[31] Simonian, N.A. y Coyle, J.T. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 83-106

[32] Thomas MJ; Chen Q; Franklin C; Rudel LL. (1997) A comparison of the kinetics of low-density lipoprotein oxidation initiated by copper or by azobis (2_amidinopropane). Free Radic Biol Med. 23 (6): 927_35.

[33] Scandilios, J.G. (1992) Molecular biology of free radical scavenging system. Cold Spring Harbor Lab. Press.

oxidativo que daña al organismo[24,34,35].

- El ambiente: La contaminación del aire, el humo del tabaco, la radiación solar excesiva, los desperdicios tóxicos, herbicidas y plaguicidas forman radicales libres. Por ejemplo, el ozono (O_3) es un contaminante ambiental extremadamente reactivo que cuando es inhalado forma radicales libres en el tejido pulmonar. Más aún, como la sangre es bombeada constantemente a los pulmones para saturarse de oxígeno, los radicales libres producidos por el O_3, pueden dañar a los glóbulos rojos, disminuyendo el suplemento de oxígeno al organismo[36,37,38].
- Reacciones en cadena: Una característica de los radicales libres es que producen reacciones en cadena, que a su vez producen otros radicales que reaccionan con otras moléculas. Si este proceso no es controlado, se produce daño celular. Este efecto dominó, es lo que hace que los radicales libres sean tan agresivos. Aunque un radical libre obtenga el electrón que le hace falta de otra molécula, no puede regresar a su estado y función originales[39].

El ozono (O_3) se genera a través de la disociación del bióxido de nitrógeno mediante la fotólisis de la luz solar para producir óxido nítrico y un átomo de

---

[34] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet. 1396-1398.

and antioxidant therapy. Lancet. 1396-1398.

[35] Aikawa R; Komuro I; Yamazaki T; Zou Y; Kudoh S; Tanaka M; Shiojima I; Hiroi Y; Yazaki Y. (1997) Oxidative stress activates extracellular signal regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. J Clin Invest. 100 (7): 1813_21.

[36] Cross, C.E., Reznick, A.Z., Packer, L., Davis, P.A., Susuki, Y.J., Halliwell, B. (1992) Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. Free Rad. Res. Comms. 15:347-352.

[37] Kennedy, C.H., Hatch, G.E., Slade, R., y Mason, R.P. (1992) Application of the ERP spin-trapping technique to the detection of radicals produced *in vivo* during inhalation exposure of rats to ozone. Toxicol. Appl. Pharmacol., 114:41-46.

[38] Harkema, J.R., Catalano, P.J. and Hotchkiss, J.A. (1997) Consequences of prolonged inhalation of ozone on F344/N rats: collaborative studies. Part XII: Atrophy of bone nasal. Res. Rep. Health Eff. Inst. 65: 1-19; 21-26.

[39] Wolff, S.P., Garner, A., Dean, R.T. (1986) Free radicals, lipids and protein degradation. TIBS 11:27-31.

oxígeno, el cual se combina con el oxígeno molecular (O_2) del aire y forma O_3[40]. En la estratosfera, la función del O_3, es formar una capa que protege de los rayos solares ultravioletas, pero en la troposfera es uno de los gases contaminantes más importantes en las zonas urbanas, ya que es el precursor de los radicales $OH^{\bullet}$. Por otro lado, el grado de toxicidad del O_3 depende de la concentración y duración de la exposición a éste[41] (ver figura 5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

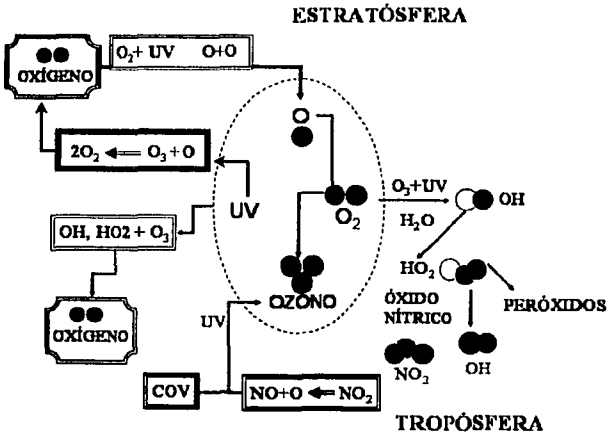


FIGURA 5. Procesos de la formación y destrucción del ozono atmosférico. En la estratosfera el ozono se forma cuando la radiación ultravioleta (UV) disocia el oxígeno molecular en atómico, el cual se combina con moléculas de oxígeno en el aire. Al mismo tiempo se observa otro ciclo, en donde la UV disocia al ozono en oxígeno atómico y molecular, los cuales se recombinan para formar ozono nuevamente; en dichas reacciones se forman radicales libres. En la troposfera, los compuestos orgánicos y el óxido de nitrógeno reaccionan en presencia de la luz solar para formar ozono. Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) derivados de la combustión de productos derivados del petróleo, también intervienen en la reacción par la formación de Ozono.

El O_3 reacciona preferentemente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas membranales y con los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos poliinsaturados, que forman parte de las membranas de las células epiteliales

[40] Menzel, D.B. y Meacher, D. (1999) Ozone and nitrogen dioxide. En: Gilbert y Colton (eds.) Reactive Oxigen Species in Biological Systems. Academic/Plenum, N.Y. pp. 335-365.

[41] Devlin, R.B., Raub, J.A. y Folinsbee, L.J. (1997) Health effects of ozone. Science and Medicine. May-Jun: 8-17.

pulmonares[42,32,43], dando como resultado la formación de aldehídos e hidroxihidroperóxido, este último al reaccionar con el agua en el citoplasma forma otra molécula de aldehído y H_2O_2 induciendo la peroxidación de los lípidos y perpetuando el daño celular[33,44] (ver figura 6).

El proceso bioquímico de la peroxidación lipídica consta de tres etapas diferentes:

1. La fase inicial tiene lugar cuando un radical libre derivado del oxígeno reacciona con un ácido graso poliinsaturado extrayendo un protón y formando un radical ácido graso.
2. La siguiente etapa o fase de propagación es la interacción de radicales ácidos grasos peroxídicos, los que a su vez reaccionan con más lípidos, proteínas o radicales libres, perpetuando la transferencia de protones y la consecuente oxidación de sustratos.
3. La resultante de esta cadena son dienos y otros productos de elevado peso molecular con propiedades fluorescentes debido a la acción de la glutation peroxidasa y el reordenamiento de ligaduras en la molécula[45].

Los radicales libres pueden difundir desde el sitio de su formación hasta otros lugares incrementando la peroxidación de ácidos grasos en sitios distantes al origen de la reacción inicial con el O_3[28,46]. En las reacciones del O_3 con los ácidos

---

[42] Castleman, W.L., Dungworth, D.L., Schwartz, L.W., Tyler, W.S. (1980) Acute respiratory bronchiolitis: an ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. Am. J. Pathol. 98:811-840.

[43] Putman, E., Liese, W., Voorhout, W.F., van Bree, L., van Golde, L.M. and Haagsman, H.P. (1997) Short term exposure affects the surface activity of pulmonary surfactant. Toxicol. Appl. Pharmacol. 142(2): 288-296.

[44] Luah, J.P. (1992) Toxicology of ozone. In Toxicology. Ed. Mosby. New York. pp. 112-117.

[45] Newsholme, E.A. and Lee, A.R. (1987) Biochemistry for medical Sciences. Ed. John Wiley and Sons, pp 256-288.

[46] Pryor, W.C., y Church, D.F. (1991) The reaction of ozone with unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as mediators of ozone toxicity. En: K.J.A. Davis (ed.), Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects, Pergamon Press, 142-212.

grasos también se forman epóxidos y dialdehidos, los cuales podrían ser los responsables de la extensión del daño celular a estructuras distantes.

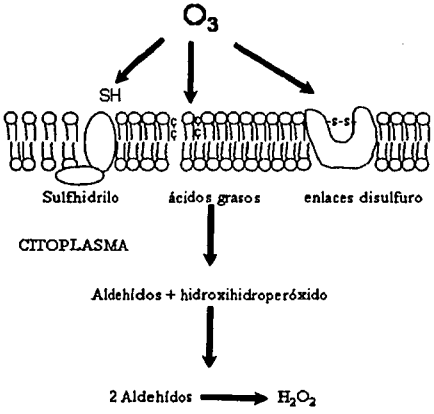


Figura 6. Sitios de reacción del O_3 con macromoléculas celulares. Los tres sitios principales son: los grupos sulfhidrilo libres en las membranas de las proteínas, los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos poliinsaturados y en los enlaces dobles disulfuro (ver texto). Modificado de Leikauf[48].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El H_2O_2 es un agente oxidante que contribuye de manera importante en la generación de radicales libres como consecuencia de su gran afinidad con las moléculas de hierro formando radicales $OH^{\cdot}$ que pueden iniciar el proceso de la peroxidación de lípidos[40,47,34]. Además de provocar peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, el O_3 también es capaz de cambiar la configuración de las enzimas, modificando la permeabilidad de las membranas citoplasmáticas y la respuesta celular[28,30,48].

---

[47] Wylie S. y Liehr JG. (1997) Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen. Arch Biochem Biophys. 346 (2): 180_6.

[48] Leikauf, G.D., Simpson, L.G., Santrock, J., Zhao, Q., Abbinate-Nissen, J., Zhou, S. y Driscoll, K.E. (1995) Airway epithelial cell responses to ozone injury. Environ. Health Perspect. 103 (suppl. 2): 91-95

Los radicales libres y el ADN

El estrés oxidativo tiene la capacidad de dañar cualquier biomolécula, como es el caso del ADN. El daño de las biomoléculas dependerá del tipo de estrés al que se esté expuesto y qué tan severa sea dicha exposición. El H_2O_2,, por ejemplo, daña principalmente al ADN de células animales. La presencia de rompimientos en las cadenas del ADN ocurre antes de que se detecte peroxidación lipídica. El daño excesivo a esta molécula se asocia a la depleción celular de ATP y $NAD^{+\cdot}$ Esto último ocurre habitualmente porque hay una enzima asociada a la cromatina, la polimerasa de poli ADP-ribosa (PARP) que rompe al NAD^+ y transfiere la porción de ADP-ribosa a las proteínas nucleares incluyéndose ella misma. Se cree que la ADP-ribosilación de las proteínas facilita la reparación del ADN; pero si esta PARP esta excesivamente activada se puede depletar el pool de NAD^+, interferir con la síntesis de ATP y llevar a la muerte celular[22].

Asma e Inflamación.

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por obstrucción bronquial y bronquiolar, hiperreactividad bronquial e inflamación de las vías aéreas[49]. Su etiología se ha relacionado con exposición ocupacional, factores genéticos y ambientales. Algunos reportes indican que la prevalencia de este

[49] Kay A.B. Asthma and Inflammation. J Allerg Clin Immunol 1991; 87:893-910.

padecimiento se ha incrementado mundialmente,[50] y este aumento se ha relacionado con un aumento en la contaminación ambiental[51] .

La inflamación genera especies reactivas de oxigeno que pueden resultar en daño al ADN[52]. La células involucradas en las reacciones alérgicas son altamente competentes en la generación de radicales libres de oxigeno (ROS). Tanto monocitos, neutrófilos y eosinófilos, así como los macrófagos tienen una amplia capacidad para generar radicales superóxido que inducen la producción de gran cantidad de ROS (e.g.: H_2O_2; OH), que llevan a un estado de stress oxidativo, mismo que ha sido involucrado en la patogénesis de las enfermedades alérgicas [(27)] [53]. Este estado de stress induce la oxidación de varias moléculas [(28)], entre ellas al ADN, y el resultado es la ruptura de sus cadenas, esto se identifica como daño genotóxico[54] [55]. Con lo referido anteriormente sería de esperar que los sujetos con antecedentes de asma tuvieran más daño genotóxico comparado con los no asmáticos, aunando a esto, los asmáticos que residen en la zona metropolitana estarán sujetos a un mayor stress por el tipo de contaminantes atmosféricos a los que están regularmente expuestos.

---

[50] Downs S.H., Maraks G.B., Sporik R., Belousva E.G., Car N.G. and Peat J.K. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. Arch Dis Child 2001; 84:20-23.

[51] Weber W. New ozone exposure thresholds signal step forward for health. The Lancet 356:1419 (2000).

[52] Dworski R. Oxidant stress in asthma. Thorax 2000; 55:S51-S53.

[53] Van Klaveren JR, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental obstructive pulmonary diseases. Current Opinion Pulm Med 1999; 5; 118-123.

[54] Anderson D, Yu WT, Phillips JB, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. Mutation Res 1994; 307:261-271.

[55] Kassie F, Parzefall W and Knasmuller S. Single Cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. Mutation Res 2000; 463:13-31.

La influencia del género

Un mayor riesgo para que se presenten una serie de padecimientos se ha asociado al género, entre ellas están las enfermedades reumáticas y cardiovasculares y algunas otras situaciones fisiológicas[56,57,58]. Habitualmente estas asociaciones se hacen con las hormonas sexuales, testosterona y estrógenos[59,60,61,62]. Para explicar estas diferencias se ha propuesto que los estrógenos tienen actividad anti-inflamatoria[63] y antioxidante[64]. Algunos reportes identifican que los cambios que se aprecian en el ciclo menstrual, son identificables, no solo en el endometrio, sino también en otros epitelios que

---

[56] Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, Collier ML, Deng KY, Jeyakumar LH, Magnuson MA, Inagami T, Kotlikoff MI, Fleischer S. Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. Nature 2002;416:334.

[57] Hodgin, J.B., Knowles, J.W., Hyung-Suk, K, Smithies, O. Maeda, N. Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. J Clin Invest. 2002; 109: 541.

[58] Sharma RV, Gurjar MV, Bhalla RC.. Selected contribution: estrogen receptor-alpha gene transfer inhibits proliferation and NF-kappaB activation in VSM cells from female rats. J Appl Physiol. 2001:91:2400.

[59] Asai, K., Hiki, N., Mimura, Y., Ogawa T., Unou, K., Kaminishi, M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. Shock 2001; 16:340.

[60] Tan M, Tan U. Sex differences in susceptibility to epileptic seizures in rats: Importance of estrous cycle. Int J Neurosci. 2001; 108: 175.

[61] McEwen BS. 2001. Estrogen effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. J Appl Physiol.91,2785.

[62] Fortoul, T.I., Saldivar, O.I., Tovar, T.A., Salazar, D., Castilla ,M.E., Olaiz-Fernandez, G. Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City Residents. Comparison of cases from the 1950s and the 1980s. Environ Hlth Persp. 1996; 104:630.

[63] Bodel, P., Dillard, G.M., Kaplan, S.S., Malawista, S.E. Anti-inflammatory effects of estradiol on human blood leukocytes. J Lab Clin Med. 1972;80: 373.

[64] Behl, C., Holsboer. F..The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. TiPS. 1999; 20: 441.

reflejan respuesta hormonal[65]. Estos antecedentes hacen pensar en la posibilidad de que sean observables diferencias en las respuestas a los contaminantes de acuerdo con el género de los individuos estudiados.

LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN LA SALUD

La manera en la que se estudian los efectos de la contaminación en la salud de las poblaciones es a través de estudios epidemiológicos, mismos que requieren de poblaciones muy grandes, y para el caso de estudio de efectos crónicos – como el caso del cáncer - hacen difícil y costosa este tipo de investigación. Se agrega además el factor de la variabilidad de respuesta en las poblaciones, lo que puede minimizar o amplificar una alteración.

Para este fin se han buscado marcadores biológicos, que reflejen la interacción del contaminante con el individuo. Con el avance de la tecnología, las posibilidades de identificar interacciones moleculares ha permitido el establecimiento de lo que se conoce actualmente como "Epidemiología Molecular"

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Esta área se considera como "la aplicación de técnicas sofisticadas para el estudio epidemiológico de material biológico". Para los epidemiólogos la "epidemiología molecular" es la incorporación de marcadores biológicos (biomarcadores) a la

[65] Koss LG. Diagnostic Cytology and its histopathologic bases. 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott Company. 1979.pp 541-2.

investigación analítica epidemiológica[66]. La ventaja del uso de los biomarcadores es que se evalúan varias células por individuo, lo que permite trabajar con poblaciones pequeñas.

BIOMARCADORES

En el campo de la Toxicología Ambiental la identificación de la interacción de los contaminantes con los sistemas biológicos, es de suma importancia ya que permite conocer "quién" interactuó con "qué". También se considera que dan información de futuros efectos adversos por exposición a xenobióticos y podrían ser de utilidad para identificar los mecanismos de toxicidad[67]

Se le llama biomarcador a aquellos elementos relacionados con la actividad de los seres vivos, que permiten identificar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa[68].

"Alteración, celular, bioquímica o molecular que es medible en medios biológicos, tales como, los tejidos, células o fluidos"

Los biomarcadores se clasifican de la siguiente manera[68]:

EXPOSICIÓN

- Es una sustancia exógena o sus metabolitos, o el producto de la interacción entre un agente xenobiótico y la molécula o célula blanco que es medido en

[66] Hulka SB. Overview of biological markers. Chap 1. in Biological Markers in Epidemiology. New York. Oxford University Press, 1990.
[67] Ward J and Henderson ER. Identification of needs in biomarker research. Environ Hlth Persp 1996; 104:895-900.
[68] Valverde RM Efectos genotóxicos por la inhalación de plomo y cadmio en ratón. Tesis de Maestría. II Biomédicas. UNAM, México DF. 1997. Pp.65.

algún compartimiento del organismo. Esta es una medición bioquímica o fisiológica, u otra alteración en el organismo.

SUSCEPTIBILIDAD

- Indican una limitación heredada o adquirida de la capacidad del un organismo para responder al reto de la exposición aun agente externo –xenobiótico-, específico.

EFECTO

- Son alteraciones bioquímicas o fisiológicas, genéticas o de otro tipo, que dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo en la salud y son producto de la exposición a un agente determinado. Estos a su vez pueden ser:
  - **EFECTO TARDÍO.** Cambio en un tejido o sistema, en el que ya hay enfermedad o un cambio irreversible
  - **EFECTO TEMPRANO.** Cambio en un tejido o en su función que puede servir como una señal de alarma. Es posible que el organismo que presenta este biomarcador no tenga manifestaciones evidentes.

La electroforesis unicelular ha sido propuesta como un biomarcador de daño temprano por agentes xenobióticos al ADN por lo que a continuación se analizan sus características.

LA ELECTROFORESIS UNICELULAR O ENSAYO COMETA

La electroforesis unicelular (SCGE) o ensayo "cometa", (Figura 7) ha sido una técnica introducida para evaluar daño temprano al ADN, como un biomarcador de daño [30]. Esta prueba se utiliza en monitoreos biológicos poblacionales ya que es relativamente fácil de llevar a cabo, y la toma de las muestras es de aquellas zonas en las que hay descamación, por ejemplo: la piel, la cavidad oral, el epitelio conjuntival y lagrimal, el epitelio nasal bronquial, aunque cualquier tipo de tejido puede ser estudiado, como el caso de la sangre. La cantidad de células requeridas para realizarlo es pequeña ($< x10^5$). Esta prueba es capaz de detectar rompimientos de ADN desde 0.1 por cada 10^9 daltones. Dependiendo de las situaciones experimentales de pH que se utilicen, esta técnica puede detectar: a pH 13 sitios álcali-lábiles, rompimientos de una cadena y sitios retardados de reparación; utilizando un pH de 12.3 detectan rompimientos de doble cadena, de una cadena y sitios retardados de reparación[69]. Se ha propuesto como un método que mide la susceptibilidad de las células al daño oxidativo, a la radiación ionizante y a la luz ultravioleta. Algunas de sus aplicaciones principales se resumen en la Tabla 1.

[69] Rojas E, Lopez MC and Valverde M, Single Cell electrophoresis assay: methodology and applications. J. Cromatography B 1999; 722:225-254.

TABLA 1. APLICACIONES DEL ENSAYO COMETA O ELECTROFORESIS UNICELULAR[69]

APLICACIÓN	MUESTRA	AGENTE O VARIABLE
Genotoxicidad (carcinogenicidad)	Espermatozoides, linfocitos humanos, sangre, medula ósea, mucosa gastrointestinal, riñón, hígado, piel, bazo,	Metales, nitrosaminas, antineoplásicos, plaguicidas
Aplicación Clínica	Linfocitos humanos	Efecto de antineoplásicos
Reparación ADN	Linfocitos humanos	Efecto de la edad, radiación, Xeroderma pigmentosum, etc
Monitoreo Ambiental	Ratones, Cel Raji, peces, aves.	Exposición a materiales peligrosos
Monitoreo Humano	Linfocitos, epitelio nasal	Exposición a tabaco, ambiente, dieta, antioxidantes

Figura 7.
Imagen que muestra el porqué se le conoce a este estudio como "COMETA". Nótese la cabeza (a) que corresponde al grueso del ADN en el núcleo y la estela (b) a los fragmentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

Nuestro interés por los efectos de la contaminación en la salud nos ha llevado a la realización de cuatro estudios. En un grupo de niños expuestos a la contaminación atmosférica y que asistían a un curso de verano en el suroeste de la Zona Metropolitana del Valle de México (VZMVM), encontramos que la sintomatología aguda era mas frecuente en nariz y ojos con reporte frecuente de epistaxis.

Cuando se relacionó la sintomatología con las concentraciones pico de ozono, se apreció un aumento de éstos a las 24 y 48 hrs. posteriores a la elevación del O_3 y no se encontró un cambio significativo en las pruebas de función respiratoria[70],[71]. Aplicando cuestionarios de sintomatología respiratoria y pruebas de funciona respiratoria, en un segundo estudio, en estudiantes de Primaria de dos zonas con diferente concentración de O_3 se encontró una mayor prevalencia de síntomas respiratorios crónicos en la zona con concentraciones mas elevadas de ozono[72].

En un tercer estudio piloto en estudiantes de Medicina a los que se les aplicó el mismo cuestionario que al grupo de niños previamente referido, y mediante cepillado nasal se utilizó la "electroforesis unicelular" en las células del epitelio nasal para la identificación de daño al ADN, encontrando que había mas daño en aquellos estudiantes que residían en el Sur de la ZMVM comparada con aquellos que residían en el Norte. También se confirmó que la sintomatología, tanto respiratoria como ocular, era mayor en los residentes del Sur.[73] Con esta misma población obtuvimos células descamadas en la lágrima y utilizando la misma técnica, identificamos que en aquellos residentes del Sur de la ciudad había más

---

[70] Fortoul TI, Lambert WE, Samet MJ, Olaiz FG, Lopez IE, Sanchez CI, Doyer M, Villadermar RL, Bliss SM, Moncada HS, Montaño B, Navarro D, Bravo AH, Sánchez AP, Rivero SO. Efectos del ozono en niños habitantes de la Ciudad de México. en Riesgos Ambientales para la Salud en la Ciudad de México. Programa Universitario del medio Ambiente. México. 1996.pp 121-126.

[71] Fortoul TI, Lambert W, Bliss M, Bravo H, Sánchez P, López I, Sánchez I, Villadelmar L, Rivero SO, Samet MJ. Acute changes in lung function associated with daily ozone exposures of children attending day camp in Mexico City. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:A496

[72] Fortoul T, Lambert W, Bravo H, Rivero O, Samet J. Prevalence of respiratory symptoms among children in Mexico City. Amer J Respir Crit Care Med 1996; 153:A480.

[73] Valverde M, Lopez MC, Lopez I, Sanchez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. Environ Mol Mutagen. 1997; 30:147-152.

síntomas oculares y más daño en el ADN de las células descamadas, comparados con los que residían en el Norte de la ZMVM[74].

OBJETIVO

Evaluar los efectos en la salud respiratoria por la exposición crónica a Ozono en habitantes de la ZMVM utilizando diversos marcadores tales como: síntomas respiratorios, Pruebas Funcionales Respiratorias, Citología Nasal y electroforesis unicelular o ensayo cometa en leucocitos de sangre periférica y células del epitelio nasal.

HIPOTESIS

La contaminación del aire ocasiona daño al sistema respiratorio, que podrá traducirse en modificaciones de la función respiratoria, sintomatología crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma o cáncer, en aquellos individuos susceptibles, posiblemente como consecuencia del daño al ADN.

METODOLOGIA

SELECCION DE LA POBLACION

Se invitó a estudiantes del primer año de la carrera en la Facultad de Medicina de la UNAM en enero de 1997. Solo se incluyeron en las evaluaciones aquellos estudiantes que tenían los estudios completos (cuestionario de síntomas, pruebas de función respiratoria, cepillado nasal y muestra de sangre). Como grupo control invitamos a los estudiantes de la Escuela de Medicina del Instituto Politécnico

[74] Rojas E, Valverde M, Lopez MC, Naufal I, Sanchez I, Bizarro P, Lopez I, Fortoul TI , Ostrosky-Wegman P. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res 2000; 428:11-17.

Nacional, con características socioeconómicas similares a las de los estudiantes de la UNAM. La población incluida fue de 37 estudiantes. La selección de este grupo se debió a que en el NO, sitio en el que se ubica la escuela de Medicina del IPN, los reportes de Ozono son habitualmente más bajos (Tabla 2).

Los estudios que se aplicaron fueron los siguientes:

- Cuestionario para identificar enfermedades respiratorias, validado en estudios previos [70,71,72]. Este cuestionario es una modificación del original propuesto por la American Thoracic Society.
- Cuestionario de síntomas el mismo día del estudio.
- Espirometría, utilizando equipos Sensormedics Mod. 921. Se siguieron los requisitos de la ATS para asegurar la calidad de las espirometrías. Los parámetros evaluados fueron Capacidad Vital Forzada (CVF), Volumen Espiratorio forzado en el primer segundo (VEF_1), Flujo Mesoespiratorio al 25 y 75% de la CVF ($FEF_{25-75\%}$), y Flujo Pico (PEF). Estos dos últimos parámetros se tomaron de los intentos que tenían la suma mayor de la CVF y del VEF_1.
- Cepillado nasal para la obtención de células para la citología nasal y para la electroforesis unicelular. En el caso de la citología, se realizó un frotis, pasando suavemente el cepillo sobre un portaobjetos, se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se evaluó para la identificación de células inflamatorias, presencia de displasia y metaplasia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Para el caso de la electroforesis unicelular, se sumergió el cepillo en un medio de cultivo, el cepillo se agitó suavemente en el vial para colectar las células que fueron arrastradas con el cepillo.
- Punción digital para obtención de sangre venosa para la realización de la electroforesis unicelular en leucocitos. La técnica resumida es la siguiente[68,74]. La sangre se centrifugó, se tomó el botón celular y al igual que las células del epitelio nasal, éstas fueron colocadas en portaobjetos esmerilados embebidos en agarosa. Las laminillas fueron colocadas en una solución de lisis, se colocaron en un buffer para electroforesis y se dejaron un tiempo para que el ADN se desenrollara; posteriormente las laminillas fueron sometidas a un campo eléctrico y teñidas con un colorante fluorescente que se une al ADN (bromuro de etidio). El ADN fragmentado migró una distancia mayor por el efecto del campo eléctrico, de esta manera la imagen que se puede observar recuerda a un cometa, con una cabeza fluorescente y una cola, la cual aumenta en longitud, cuando la ruptura del ADN es mayor (Figura 8). Este parámetro se evaluó con un ocular graduado y el resultado fue en μm, de un promedio de 50 células evaluadas en cada caso.

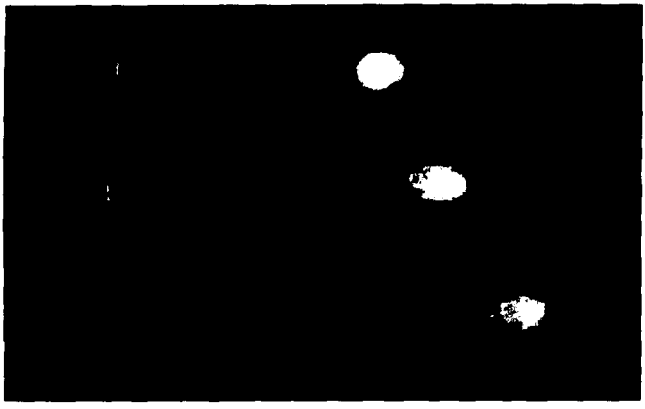


Figura 8. Imágenes con diferente grado de lesión, que se identifica por el largo de la cola. (a) Núcleo sin ADN fragmentado evidente, (b) fragmentación moderada y (c) célula con mayor daño.

De acuerdo con Anderson y cols. [29], por la longitud de las colas de los cometas se categorizó el daño en tres posibilidades:

Leve	**(0-20μm)**
Moderado	**(21-40μm)**
Severo	**(> 40 μm)**

MEDICIÓN DE CONTAMINANTES

Los datos se obtuvieron de los reportes de la Comisión Metropolitana para la Calidad del Aire y se incluyeron Ozono, NOx, SO_2 y PM_{10}. Se sacó el promedio de las concentraciones de Ozono por mes y el valor acumulado de diciembre de 1996 a Mayo de 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Medición de los contaminantes

La tabla 2 muestra el promedio de los valores de la concentración de O_3 reportadas por la Red Automática de Monitoreo Ambiental en ppb. En promedio, las concentraciones mas elevadas se reportan en el SO, seguido del SE. Esto da como resultado que el acumulado también sea más elevado en esas zonas. El sitio que consideramos como control tiene una concentración acumulada de 380 ppb, comparada con 659 ppb del SO.

TABLA 2
PROMEDIO MENSUAL Y PROMEDIO ACUMULADO DE OZONO EN PARTES POR BILLON

Mes	NO	NE	SO	*SE*
Diciembre (96)	55	50	125	*81*
Enero (97)	59	60	95	*66*
Febrero (97)	50	73	83	*65*
Marzo (97)	76	94	131	*77*
Abril (97)	51	64	110	*78*
Mayo (97)	89	96	115	*121*
Acumulado	*380*	*437*	*659*	*488*

La población total evaluada fue de 239 estudiantes del primer año de la carrera de Medicina de la UNAM de los cuales el 63% eran mujeres. Del total de la población, el 6.2% tiene antecedentes de asma (Tabla 3). La mayor parte de los asmáticos

residían en el Sur de la Ciudad (60%) y el antecedente de hábito tabáquico en ambas poblaciones fue semejante, no influyendo en la genotoxicidad. Tos y sibilancias al contacto con aire frío fueron significativamente mas frecuentes en la población de asmáticos. El estudio citológico del epitelio nasal mostró la presencia de metaplasia escamosa en el 40% de los asmáticos y en el 30% de los no asmáticos (Figuras 9 A y B). En el caso de los asmáticos la presencia de eosinófilos fue muy evidente comparada con los no asmáticos (Figura 10).

Cuando se evaluó el daño genotóxico en el epitelio nasal y en leucocitos de sangre periférica, los valores fueron mas altos en epitelio nasal en asmáticos y en leucocitos en no asmáticos (Tabla 4 y Figura 11).

Tabla 3. Información General de la Población Estudiada identificados por el antecedente de Asma.[75]

VARIABLE	Asmáticos (15)	No Asmáticos (224)	p (X^2)
Genero			
Hombres	5	83	NS
Mujeres	10	141	
Edad (RANGO)	19-21 años	18-28 años	
Lugar de residencia			
NORTE	6	129	NS
SUR	9	95	
FUMADORES < 10	7	112	NS
NO FUMADORES	8	112	
TOS			
EJERCICIO	5	44	NS
AIRE FRIO	9	78	S
SIBILANCIAS			
EJERCICIO	2	8	NS
AIRE FRIO	9	78	S
METAPLASIA ESCAMOSA	6	66	NS

X^2 Prueba exacta de Fisher NS Sin significancia estadística S= Estadísticamente significativo ($p<0.05$)

[75]*Fortoul T.I., Valverde M, López M C, Bizarro P, López I, Sánchez I, Colín-Barenque L, Avila-Costa M R, Rojas E. and Ostrosky Wegman, P. Single Cell Gel Electrophoresis Assay in nasal Epithelium and leukocytes in asthmatic subjects. Arch Environmental Health (aceptado Agosto) **2002.**

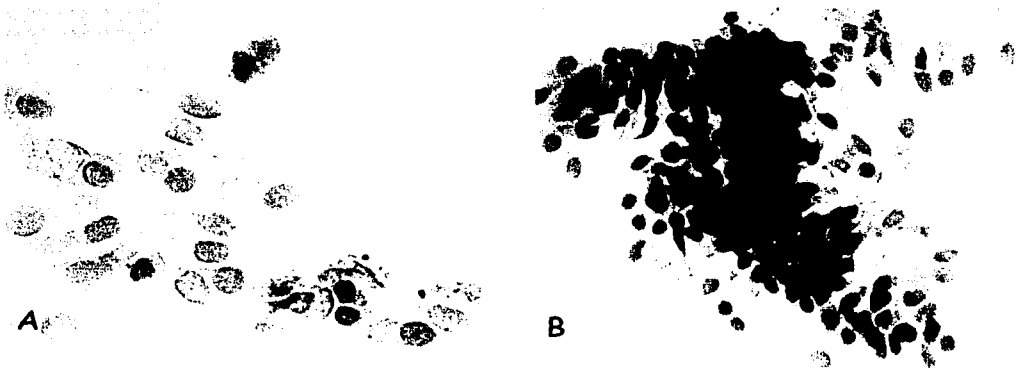


Figura 9. (A) Se aprecian células ciliadas (c), basales y algunas mucoproductoras HE. 400X. (B) En este caso es notable el cambio en las características del epitelio respiratorio normal que cambió por uno escamoso. HE. 100X

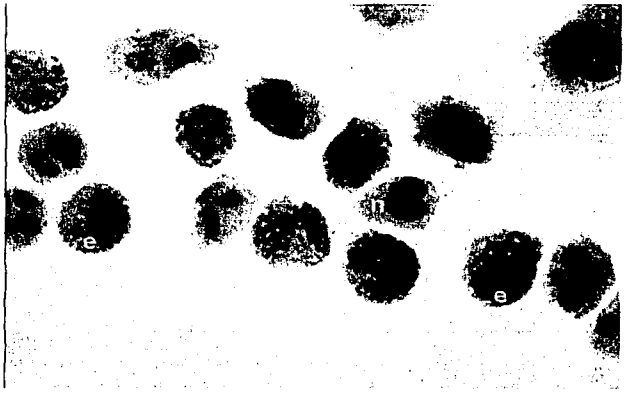


Figura 10. Citología del cepillado nasal de un estudiante asmático. Es notable la gran cantidad de eosinófilos que predominan (e). También se observan varios neutrófilos (n)
HE 1000X.

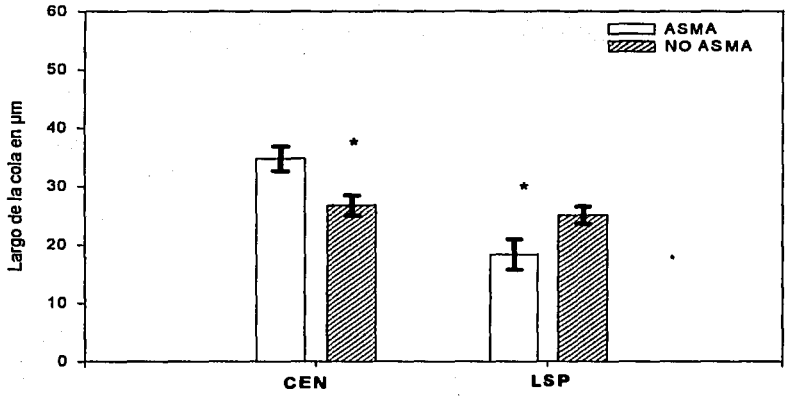
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Comparación del largo de la cola entre Asmáticos y No Asmáticos.

Estudio en Células del Epitelio Nasal y en Leucocitos de Sangre Periférica [40].

	Asmáticos (15)	No Asmáticos (224)	p*
CEN	34.7±2.1	26.7± 1.7	<0.05
LSP	18.3± 2.6	25.0± 1.5	<0.03

*U de Mann Whitney (p<0.05)
CEN Células del Epitelio Nasal
LSP Leucocitos de Sangre Periférica



* U de Mann Whitney (p<0.05) (±SE)

CEN Celulas del Epitelio Nasal
LSP Leucocitos de Sangre Periférica

Figura 11. Diferencias en el daño genotóxico entre Asmáticos y no asmáticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Del total se tomó un grupo de 200 estudiantes y se hizo una comparación por género. En la Tabla 5 se resumen los datos del estudio "cometa" realizados en el epitelio nasal y en los leucocitos de sangre periférica. Comparando hombres y mujeres en nuestra población de la UNAM –considerada como expuesta-, fue evidente un mayor daño genotóxico en los hombres expuestos comparado con las mujeres (Tabla 5 y Figura 11). Es muy notorio el daño en leucocitos en los hombres expuestos comparados con los grupos control.

Cuando se comparan los grupos expuestos con aquellos estudiantes residentes en el NO, los valores son mucho menores. En estos grupos se realizó también citología nasal y pudo apreciarse una mayor presencia de células inflamatorias –neutrófilos- en los residentes de SO y mayor frecuencia de metaplasia escamosa (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencias por género en el daño genotóxico evaluado por la Electroforesis Unicelular. Comparación con un grupo control.

Variable	Hombres		Mujeres		
N	Controles (9)	Expuestos (77)	Controles (28)	Expuestos(123)	
CEN	17.1±1.5	33.6 ±2.6*	16.8 ±0.6	27.1± 1.5	p<0.01*
LSP	17.4±0.7	48.3± 1.2*	15.7 ±0.8	28.8±2.7	P<0.01*
Metaplasia	42%	88%	40%	69%	

U de Mann Withney (p<0.05)
Diferencias estadísticamente significativas ♂ Expuesto vs ♂ Control; ♀ Expuesta vs ♀Control
♂ Expuesto vs ♀ Expuesta

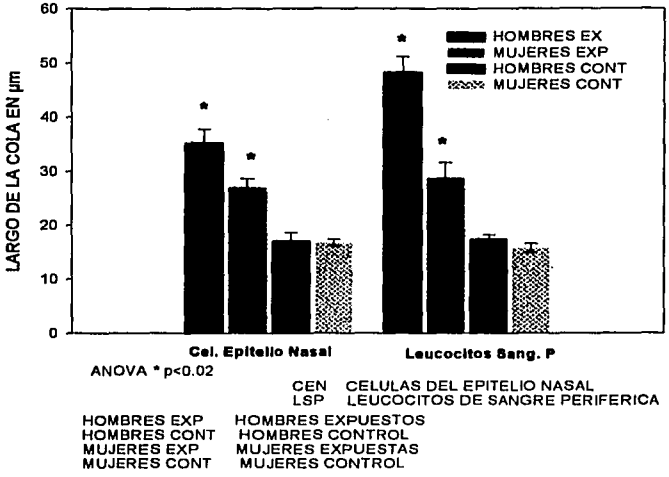


Figura 12. Diferencias en el daño genotóxico en células del epitelio nasal y de leucocitos de sangre periférica por género.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Sistema respiratorio

El Sistema respiratorio es uno de los sitios del organismo mas expuesto a un ambiente contaminado y esto no es de extrañar ya que se inhalan de 10,000 a 20,000 litros de aire al día y se expone a 3,000 Kg. o 3 Ton de aire al año y aproximadamente 3 g de substancias tóxicas cada año, si la concentración de un "x" contaminante fuera solo de 1 ppm[76].

[76] Mustafa GM and Tierney FD. Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone and nitrogen dioxide toxicity. Am Rev Respir Dis 1978; 118:1061-1090.

Contaminación Atmosférica

Se ha referido que la exposición a los contaminantes, especialmente al ozono ha disminuido, sin embargo las concentraciones se mantienen en un rango semejante a los que teníamos hace algunos años, ya que el valor acumulado de la exposición se mantiene. Lo que no se menciona es que prácticamente todos los días se rebasa la Norma Mexicana de calidad del Aire para Ozono (0.11 ppm no mas de una hora por tres meses).

Daño genotóxico

El monitoreo biológico en poblaciones humanas expuestas a los agentes potencialmente mutagénicos o carcinogénicos es de utilidad para tener información de los posibles riesgos de enfermedades genéticas o cáncer. Este tipo de estudios ha servido para identificar los factores de riesgo cuando aún no se han establecido medidas de control. Este biomonitoreo se puede realizar utilizando diferentes biomarcadores. Entre los Marcadores Citogenéticos más frecuentemente utilizados se tienen: Aberraciones cromosómicas, Identificación de Micronúcleos y el Intercambio de cromátidas hermanas. En los últimos años se ha utilizado la electroforesis unicelular (SCGE) o ensayo "Cometa". Mientras que las pruebas citogenéticas generalmente se limitan al uso de linfocitos y la proliferación celular; el "cometa" se puede utilizar en células de todo tipo y de aquellos sitios que son el primer contacto de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos. Como se mencionó anteriormente esta prueba es rápida y para su uso se requieren pocas células. Los

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

antecedentes del ensayo "Cometa" se iniciaron con Rydberg y Johanson[29] (1978) cuando utilizando condiciones alcalinas moderadas en células embebidas en agarosa, pudieron identificar rompimiento de una o de dos cadenas de ADN. Posteriormente Ostling y Johanson[29], utilizando una cámara de electroforesis crearon la prueba de la electroforesis unicelular SCGE. Estas células eran tratadas con detergentes con una elevada concentración de sales y lisadas, liberando al ADN y corridas en un medio en condiciones neutras. La corriente eléctrica empujaba el ADN hacia el ánodo, resultando en las imágenes características que ya se mostraron en la introducción. Estas condiciones solo permitían la identificación de rompimientos de dos cadenas, ya que en este pH las cadenas no se separan. Posteriormente Singh y cols[2], modificaron la técnica utilizando condiciones alcalinas, con un pH>13 que permitió, no solo identificar los rompimientos de una cadena, sino además los sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos del ADN y sitios de reparación incompleta[77]. Este estudio nos permitió identificar la sensibilidad de la técnica para detectar, que en el caso de exposición a contaminantes atmosféricos, el epitelio nasal[78] es muy sensible y nos permitió identificar diferencias con otro tipo celular, los leucocitos. Además, notamos que el daño al ADN de los leucocitos en sangre periférica muestra un comportamiento diferente al del epitelio nasal. En el caso de los asmáticos por ejemplo, el epitelio nasal presentó más daño comparado con los no asmáticos,

---

[77] Singh NP, McCoy MT, Tice EL, Schnider A. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; 175:184-191.
[78] Gluck U, Gebbers OJ. The comet assay of nasal epithelia: Measurement of DNA damage of the assessment of genotoxic air pollution. The Laringoscope 2000; 110:123-125.

situación que relacionamos con varios factores, los cuales mencionaremos más adelante. De igual manera, la prueba nos permitió identificar una respuesta diferente a la exposición a contaminantes dependiendo del género del individuo. Consideramos que sería ideal hacer un seguimiento de estas poblaciones que continúan sometidas a los mismos contaminantes por varios años, con el fin de identificar qué tipo de modificaciones presentan. Esta situación nos haría pensar en un aumento en la prevalencia de cáncer nasal, ya que éste es el primer epitelio de contacto con los contaminantes.

Metaplasia

La metaplasia se considera un una modificación reversible de un epitelio que cambia por otra variante epitelial normal pero que no corresponde al sitio anatómico. Este cambio se presenta por una modificación en la programación de las células madre, condicionada por citocinas, factores de crecimiento y componentes del tejido conectivo. Esta alteración puede progresar hacia cambios neoplásicos[79]. Se reporta que una alteración en algunas de las moléculas de adhesión, como es el caso de las caderinas pudieran estar relacionadas con la modulación del fenotipo del epitelio e inducir la metaplasia[80]. Este cambio en la

[79] Patología Celular II: Adaptaciones, acumulaciones intracelulares y envejecimiento celular. En Robbins Patología Estructural y Funcional. Madrid, McGraw Hill Interamericana, 2000. p.33.

[80] Perry I,Hardy R, Tselepis R, Jankowski JA. Cadherin adhesion in the intestinal crypt regulates morphogenesis, mitogenesis , mutagenesis, and metaplasia formation. Br.M.J 1999; 52:166-168.

estructura del epitelio se ha identificado claramente en el cáncer cérvico-uterino y en el pulmonar, casos en el que los cambios del epitelio llevan una secuencia de eventos desde la inflamación, pasando por la metaplasia, displasia, evolucionando hasta una alteración definida. Para que esto suceda debe de ocurrir en algún momento, la iniciación de una o varias células que implica una alteración en el genoma – una mutación - que no es visible y que requirió de varios ciclos celulares para fijarse. Esto puede ocurrir espontáneamente, ser inducida por hormonas o por el metabolismo de agentes xenobióticos. Posteriormente, otro agente favorece la proliferación de las células iniciadas, a estos agentes se le conoce como promotores y posteriormente ocurre la progresión, que será el crecimiento de estas células ya alteradas[81]. Con los datos que tenemos en este momento, no podemos afirmar que esto ocurra en los sujetos con mayor daño al ADN en el epitelio nasal y la presencia de metaplasia, situación por la que es recomendable llevar un seguimiento de esta población. Lo que sí fue evidente es que la población residente en la ZMCM tiene una elevada prevalencia de este cambio en el epitelio que puede también relacionarse con manifestaciones clínicas como: rinorrea continua, prurito nasal y epistaxis.

Habito tabáquico

El ensayo "Cometa" se ha utilizado también para evaluar el efecto que el tabaco tiene en los sujetos fumadores e identificar si hay modificaciones en la cantidad de

[81] Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of Poisons. 5th edition. McGrawHill, New York, 1996.p226-227

daño en los exfumadores[82]. Sin embargo existen reportes que mencionan que aquellos sujetos que fuman menos de 10 cigarros diarios no reflejan daño genotóxico[83], al igual que la población que estudiamos.

Asma

El asma se identifica como una enfermedad respiratoria crónica que se caracteriza por obstrucción bronquial, hiperreactividad e inflamación crónica[84]. Se han encontrado algunas evidencias de la participación ocupacional, de factores genéticos y ambientales en el desarrollo del padecimiento. Algunos reportes indican un aumento en la prevalencia de esta enfermedad con una distribución mundial[85] y este incremento se ha relacionado con un aumento aparejado de la contaminación atmosférica[86]. En la inflamación del sujeto asmático, hay una población de células con una gran capacidad para generar especies reactivas de oxigeno (ROS), e inducir ruptura de las cadenas del ADN[87]. Además de los eosinófilos, existe la presencia de neutrófilos y macrófagos que también tienen la capacidad de generar ROS[10]. Esta situación induce lo que se conoce como un

---

[82] Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Giannessi L, Maggiorelli F, Paoletti P, Barale R. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. Mutat Res 1997; 375:117-123.

[83] Rojas E, Valverde M, Sordo M, Otrosky-Wegman P. DNA damage in exfoliated bucal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res 1996; 370: 15- 120.

[84] Kay A.B. Asthma and Inflammation Allerg Clin Immunol 1999; 187:893-910

[85] Downs S.H., Maraks G.B., Sporik R., Belousva E.G., Car N.G. and Peat J.K. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. Arch Dis Child 2001; 84:20-23.

[86] Weber W. New ozone exposure thresholds signal step forward for health. The Lancet 2000; 356:1419.

[87] Dworski R. Oxidant stress in asthma. Thorax 2000; 55:S51-S53.

estado de "estrés oxidativo" que se ha involucrado en la patogénesis del asma y otras enfermedades alérgicas [10, 88]. Este estado de estrés induce la oxidación de varias biomoléculas, como es el caso del ADN, lo que se considera como daño genotóxico [10,11,28,29]. Es muy probable que los sujetos con asma, al presentar una mayor cantidad de eosinófilos en el epitelio nasal tengan una mayor liberación de agentes oxidantes que produzcan mas daño genotóxico en estas células. El por qué no hubo mas daño en los leucocitos de sangre periférica de los sujetos asmáticos, puede postularse como que el epitelio sobre-estimulado mantiene un filtro muy activo contra el paso de diversos agentes tóxicos hacia el torrente sanguíneo impidiendo el paso de ROS hacia la circulación general. Sería importante evaluar el estado de los sistemas antioxidantes en el epitelio nasal en estos sujetos ya que muy posiblemente estarán muy activos.

Genero

Por muchas décadas la influencia del género en las respuestas del organismo ante diversas situaciones fisiológicas fisiopatologías, metabólicas y toxicológicas no fue considerada. Se postula que durante la fase estrogénica hay una mayor incidencia de cuadros asmáticos, mientras que en la fase lútea no y parece ser que la progesterona tiene efecto broncodilatador. Las mujeres posmenopáusicas tienen

[88] Van Klaveren JR, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental Obstructive pulmonary diseases. Current Opinion Pulm Med 1999; 5:118- 123.

menor riesgo de desarrollar exacerbaciones, pero si se inicia tratamiento sustitutivo, el riesgo aumenta.

Hay algunas evidencias que el efecto del tabaco es diferencial entre hombre y mujeres. En estas últimas el efecto es sobre la vasculatura, mientras en los hombres lo son las vías aéreas[89].

Varios estudios refieren el efecto anti-inflamatorio que ejercen los estrógenos en diversas células y estructuras. Una de ellas es el Sistema Nervioso Central en el que se ha visto un cierto efecto protector de los estrógenos[90].

¿Qué significado biológico tiene el daño al ADN? Por el momento no lo sabemos, pero podría llevar a cambios como la metaplasia que se encuentra en la mayor parte de la población que se estudió y que este cambio podría llevar a una alteración en la actividad metabólica del epitelio nasal, misma que tiene que ver con el metabolismo de agentes xenobióticos y que en un cierto tiempo podría manifestarse como otro tipo de lesiones en vías respiratorias bajas que pueden ir desde cambios en la bioquímica del moco[91], inducción enzimática y modificación del metabolismo de algunos xenobióticos, como ocurre en el caso de la exposición al humo del tabaco en los fumadores, la enfermedad pulmonar obstructiva

---

[89] Becklage RM and Kauffmann F. Gender differences in air behavior over the human life span. Thorax 1999; 54:1119-1138.

[90] Vegeto E, Bonincorto C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P and Maggi A. Estrogen prevents the lypopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. J Neurosci 2001; 21:1809-1818.

[91] Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucocilliary clearance in health and disease. Eur Respir J 1999;13:1177-1188.

crónica, fibrosis pulmonar o cáncer. Esta última alteración no solo limitada al sistema respiratorio, sino a otros sitios del organismo[92,93].

Biomarcadores

Como se mencionó anteriormente, hay varios tipos de biomarcadores y de ellos los cambios genotóxicos encontrados en estos estudiantes pueden indicar un efecto temprano cuya implicación biológica específica aún no está bien delimitada. Se sabe que los que tienen mayor daño genotóxico tendrán más posibilidades de desarrollar cambios celulares que pueden llegar a la transformación neoplásica. En este estudio observamos que el uso del ensayo cometa permitió identificar que los sujetos con antecedente de asma y los estudiantes del sexo masculino tienen mayor riesgo de daño al ADN. En este caso el biomarcador que utilizamos podría utilizarse como evaluador de riesgo[94], el cual permitiría tomar medidas para orientar a estos grupos para hacerles un seguimiento – en el caso de los asmáticos – y de prevención - en el caso de los sujetos de sexo masculino -. La identificación de algún biomarcador que ayude a disminuir riesgos, que proporcione un mejor plan terapéutico y permita limitar las consecuencias de la exposición a los contaminantes, será de mucha utilidad en el campo clínico, en el que debería de

---

92 Morgan TK, Gross EA, Joyner D, Mery S. Mapping lesions in the nose provides insight into mechanisms of lesions of action on nasal toxicant. Chemical Industry Institute of Toxicology 1995; 15:1-12.

93 Patología Celular II: Adaptaciones, acumulaciones intracelulares y envejecimiento celular. En Robbins Patología Estructural y Funcional. Madrid, McGraw Hill Interamericana, 2000. p.33.

94 Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Yóung SD. Biomarkers of chemical exposure: State of the Art. Clin Chem 1994; 40:1360-1362.

haber más utilización de técnicas moleculares en ayuda de los pacientes y de aquellas poblaciones en gran riesgo por exposición a diversos agentes contaminantes.

Conclusiones

Mucho hay aún que responder sobre la interacción de los contaminantes con el epitelio respiratorio y la participación sistémica mediada por este epitelio que tiene una gran actividad metabólica.

La identificación de los cambios en los componentes del epitelio nasal, la inducción de citocinas y otra serie de marcadores ayudará a encontrar respuesta a varias preguntas.

En cuanto a la diferencia genérica, deberá hacerse un estudio en sujetos mayores de 60 años para identificar si hay cambios en la respuesta del epitelio ante las modificaciones hormonales que se presentan, así como la utilidad de la terapia sustitutiva en las mujeres menopáusicas.