

03069  
6  
2eje.

**HIPERREACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS DEL  
COBAYO POR EXPOSICION A OZONO.  
CARACTERIZACION Y MECANISMOS DE  
PRODUCCION**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS  
PRESENTA:

**MVZ PATRICIA SEGURA MEDINA**

TUTOR:

**Dr. Mario Humberto Vargas Becerra**

COASESORES:

**Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez**

**Dr. Carlos Paz Tres**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

**Para mi Esposo Jorge:**

Porque sabiamente me transmite su paz en los momentos de más desesperación, su apoyo en los de agobio, pero principalmente su amor en todos los instantes de mi vida. Te amo.

**Para mis Padres y mis Suegros**  
con todo mi amor y mi respeto  
por todo su cariño y su ternura.

**Para mis Hermanos y en especial**  
para mi Alma Gemela Claudia.

En memoria del Sr. Antonio Lozada. †  
cuyo apoyo laboral recordare por  
siempre.

## AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Mario H. Vargas B. y Luis M. Montaña.  
Por transmitirme sus conocimientos de manera incondicional  
y cuyo empeño y apoyo han permitido que este trabajo sea  
una realidad.

A los Drs. Carlos Paz Tres, María G. Campos, Héctor Ponce  
M. y E. Alonso de Florida.†  
Cuyos sabios consejos han enriquecido de manera invaluable  
este trabajo de investigación.

A los cobayos  
que han dado su  
vida por el  
conocimiento  
científico.

## INDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN .....	i
ABREVIATURAS .....	ii
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....	iii
INTRODUCCION .....	1
Ozono .....	1
Efectos toxicológicos del ozono .....	2
Alteraciones funcionales respiratorias .....	2
Hiperreactividad de las vías aéreas .....	3
Mecanismos de hiperreactividad por ozono: ..	4
Daño epitelial .....	4
Inflamación de las vías aéreas .....	5
Alteraciones neurales .....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	8
HIPOTESIS .....	9
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	10
MATERIAL Y METODOS .....	11
Animales .....	11
Exposición a ozono .....	11
Medición de la reactividad de las vías aéreas ..	11
Lavado broncoalveolar .....	12
Fármacos .....	13
Análisis estadístico .....	13
RESULTADOS .....	14
Curvas a acetilcolina .....	14
Lavado broncoalveolar (acetilcolina) .....	14
Curvas a histamina .....	21
Lavado broncoalveolar (histamina) .....	21
Curvas a sustancia P .....	26
Lavado broncoalveolar (sustancia P) .....	26
DISCUSION .....	30
Reactividad de las vías aéreas a acetilcolina ..	30
Reactividad de las vías aéreas a histamina ..	32
Reactividad de las vías aéreas a sustancia P ..	34
Efecto del ozono sobre las células inflamatorias del lavado broncoalveolar ...	36
CONCLUSIONES .....	39
REFERENCIAS .....	40

## HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AERIAS DEL COBAYO POR EXPOSICIÓN A OZONO. CARACTERIZACIÓN Y MECANISMOS DE PRODUCCIÓN

### RESUMEN

El ozono ( $O_3$ ) es uno de los principales contaminantes atmosféricos en las grandes urbes como la Ciudad de México. Entre las alteraciones que ocasiona están la infiltración neutrofílica y la hiperreactividad de las vías aéreas, pero aún existe controversia de si ambos fenómenos son independientes o tienen una relación causa-efecto. Para evaluar esta última posibilidad, se realizaron curvas dosis-respuesta no acumulativas con acetilcolina (ACh) (0.32 a 3.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.), histamina (0.01 a 1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.), y sustancia P (0.0056 a 1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) en cobayos machos con o sin exposición previa a  $O_3$  (0.3, 0.6 ó 1.2 ppm por 4 h, 16-18 h antes del estudio). En todos los cobayos se realizó un lavado broncoalveolar (LBA) al final de la curva. La respuesta bronquial a los agonistas constrictores se evaluó como incremento de la presión de insuflación pulmonar. Se observó en los cobayos evaluados con ACh que la exposición a  $O_3$  en ningún grupo experimental incrementó significativamente la reactividad de las vías aéreas al agonista, así como no hubo asociación entre la respuesta broncoconstrictora y la concentración de  $O_3$  inhalada. Las células recuperadas en el LBA no sufrieron modificaciones por la exposición al  $O_3$ , ni en su número, ni en su composición poblacional, aunque el incremento en número absoluto de neutrófilos se correlacionó con la concentración de  $O_3$  inhalada ( $r=0.38$ ,  $p<0.05$ ). La exposición aguda a  $O_3$  incrementó significativamente la reactividad de las vías aéreas a la histamina en los cobayos expuestos a 1.2 ppm de  $O_3$  ( $p<0.01$ ), existiendo correlación entre el grado de reactividad y la concentración de  $O_3$  inhalada ( $p<0.0001$ ). El número de células totales se incrementó en el grupo de 1.2 ppm de  $O_3$  ( $p<0.05$ ) y en forma global tuvo correlación con la concentración de  $O_3$  ( $r=0.37$ ,  $p<0.05$ ) y la reactividad a la histamina ( $r=0.35$ ,  $p<0.05$ ). Asimismo, la población de neutrófilos se incrementó ( $p<0.01$ ) en los grupos expuestos a 0.3 y 1.2 ppm de  $O_3$ . Sin embargo, no existió correlación entre el número de neutrófilos y la reactividad a la histamina o la concentración de  $O_3$ . Finalmente para la sustancia P, la exposición al  $O_3$  produjo hiperreactividad en todos los grupos expuestos al  $O_3$ : 0.3 ppm ( $p<0.01$ ), 0.6 ppm ( $p<0.05$ ) y 1.2 ppm ( $p<0.05$ ), sin que se asociara la reactividad con la concentración inhalada ( $r=0.35$ ). Los LBA no se modificaron por la exposición al  $O_3$ , ni en la cuenta total celular, ni en la cuenta diferencial, para ningún grupo experimental. Estos resultados muestran que el efecto que el  $O_3$  genera en las vías aéreas se manifiesta de diferentes maneras de acuerdo con el agonista con el que se evalúa: 1) Con ACh no hay hiperreactividad ya que no se modificó la respuesta broncoconstrictora ni la celularidad de las vías aéreas. 2) Para la histamina genera hiperreactividad dependiente de la concentración inhalada y probablemente se presenta como consecuencia de un proceso inflamatorio, sin que se haya podido determinar cuál es el principal tipo celular involucrado. 3) La SP es una herramienta farmacológica más sensible a la exposición al  $O_3$ , ya que se observó hiperreactividad desde una concentración muy baja que se alcanza en la Cd. de México.

### ABREVIATURAS

O <sub>3</sub>	Ozono
ACh	Acetilcolina
Hist.	Histamina
SP	Sustancia P
LBA	Lavado broncoalveolar
ppm	Partes por millón
EPN	Endopeptidasa neutra
CTC	Cuenta total celular
CD	Cuenta diferencial
-LogDE50%	Logaritmo negativo de la dosis efectiva cincuenta porciento
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
NANC	Sistema contractil no adrenérgico no colinérgico
i.v.	Vía intravenosa
r=	Coefficiente de correlación
PMN	Polimorfonucleares

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Tabla 1.	Efecto del ozono en la reactividad de las vías aéreas a la acetilcolina .....	15
Tabla 2.	Efecto del ozono en la reactividad de las vías aéreas a la histamina .....	22
Tabla 3.	Efecto del ozono en la reactividad de las vías aéreas a la sustancia P .....	27
Figura 1	Curva no acumulativa a acetilcolina .....	16
Figura 2	Efecto del ozono en la reactividad de las vías aéreas a diversos agonistas .....	17
Figura 3	Correlación entre la reactividad de las vías aéreas y la concentración de ozono .....	18
Figura 4	Lavado broncoalveolar (acetilcolina) .....	19
Figura 5	Correlación entre neutrófilos presentes en el LBA y la concentración de ozono .....	20
Figura 6	Curva no acumulativa a histamina .....	23
Figura 7	Lavado broncoalveolar (histamina) .....	24
Figura 8	A: Correlación entre la concentración de ozono y la CTC (histamina) .....	25
	B: Correlación entre -LogDE50% y la CTC (histamina) .....	25
Figura 9	Curva no acumulativa a sustancia P .....	28
Figura 10	Lavado broncoalveolar (sustancia P) .....	29



## INTRODUCCION

### Ozono

El ozono ( $O_3$ ) es un gas cuya molécula esta formada por tres átomos de oxígeno. Esta forma alótropa reactiva del oxígeno constituye un importante componente de la atmósfera. La mayor concentración de  $O_3$  atmosférico se localiza en la estratósfera (de 15 a 45 Km de altura) formando una capa que absorbe la radiación solar ultravioleta a una concentración superior a 10 ppm<sup>59</sup>.

En la tropósfera (capa que se halla en contacto con la superficie de la tierra) la presencia natural de  $O_3$ , sin perturbaciones causadas por el hombre es normal y de gran importancia, ya que es un precursor del radical oxhidrilo<sup>69</sup>, siempre y cuando su concentración no rebase 0.1 ppm; dicha concentración varía dependiendo de la altitud geográfica, la radiación solar, y las condiciones climáticas de la zona<sup>49</sup>.

El  $O_3$  se clasifica como un contaminante secundario ya que se forma a partir de otros agentes tóxicos, como los óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ) y compuestos orgánicos volátiles (hidrocarburos reactivos), los cuales, mediante una serie de reacciones químicas dependientes totalmente de la radiación solar, conforman al  $O_3$  <sup>69</sup>. Bajo condiciones normales, el  $O_3$  es una molécula muy inestable ya que rápidamente regresa a oxígeno molecular. Desafortunadamente el incremento en la emisión antropogénica de los precursores del  $O_3$  ha hecho que este gas se acumule convirtiéndose en el principal componente de la contaminación atmosférica fotoquímica<sup>11</sup>.

En los últimos años, la contaminación atmosférica por  $O_3$  se ha incrementado notablemente en la Ciudad de México, alcanzando promedios hasta de 0.42 ppm<sup>60</sup>, por lo que resulta de gran importancia conocer los efectos nocivos que este contaminante puede ocasionar sobre la salud humana. Se ha establecido que la concentración máxima de exposición a la que puede estar sujeto el hombre, sin que al parecer concurren efectos adversos en su salud, es 235  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (0.11 ppm), valor

que constituye un promedio por hora que no debe de excederse más de una vez por año<sup>69,61</sup>.

Se ha demostrado que la inhalación de concentraciones de O<sub>3</sub> por arriba del límite permisible es capaz de producir diversos efectos tóxicos sobre la salud tanto en el hombre como en los animales<sup>69</sup>.

#### *Efectos toxicológicos del ozono*

Las membranas celulares constituyen el principal blanco de la toxicidad del O<sub>3</sub>. Este gas genera la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas celulares, y oxida a diversas proteínas membranales estructurales y citosólicas (enzimas citosólicas, microsomales y mitocondriales)<sup>59</sup>. Estas alteraciones bioquímicas parecen ser la base de los efectos nocivos que este gas irritante es capaz de desencadenar.

Durante la inhalación de O<sub>3</sub> las vías aéreas constituyen la primer barrera tisular expuesta a sus efectos dañinos y en ellas es capaz de desencadenar diversas alteraciones bioquímicas, morfológicas y funcionales.<sup>69, 28, 42</sup>

#### *Alteraciones funcionales respiratorias*

La exposición al O<sub>3</sub> modifica los patrones respiratorios desde concentraciones tan bajas como 0.26 ppm durante 2 horas tanto en humanos<sup>20</sup> como en diversas especies animales<sup>1</sup>. Este agente disminuye los volúmenes y flujos pulmonares e incrementa la resistencia de las vías aéreas. La gravedad de estas anomalías varía en forma directamente proporcional a la concentración de O<sub>3</sub> inhalada<sup>31</sup>.

Otra alteración funcional importante que puede desencadenar el O<sub>3</sub> es la hiperreactividad de las vías aéreas, la cual consiste en un aumento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial a diferentes estímulos broncoconstrictores. En este sentido, se sabe que la inhalación aguda de 0.18 a 0.4 ppm de O<sub>3</sub> en humanos<sup>74,48</sup> ó de 1 a 3 ppm en cobayos<sup>53,15</sup> y perros<sup>38b</sup> produce hiperreactividad de las vías aéreas.

### Hiperreactividad de las vías aéreas

El asma bronquial es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de diversos grados de obstrucción reversible de las vías aéreas y se desencadena como una respuesta exagerada del músculo liso traqueobronquial a una gran variedad de estímulos físicos o farmacológicos. Las principales características del asma son la hiperreactividad de las vías aéreas, la broncoconstricción reversible y la inflamación<sup>18</sup>.

Los mecanismos patogénicos involucrados tanto en la hiperreactividad como en la inflamación crónica de las vías aéreas no se conocen completamente, por lo que se han desarrollado diversos modelos experimentales en animales de laboratorio. El cobayo ha sido utilizado desde hace 90 años como un modelo muy eficaz de hiperreactividad de las vías aéreas<sup>14</sup>.

Los modelos experimentales de hiperreactividad de las vías aéreas se han desarrollado utilizando diversas técnicas inmunológicas y no inmunológicas. Entre los modelos inmunológicos de hiperreactividad bronquial tenemos la sensibilización de cobayos con proteínas de alto peso molecular como la ovoalbúmina<sup>70</sup>, la inmunización de conejos por vía inhalatoria con *Alternaria tenius*<sup>63</sup>, así como el desarrollo de hiperreactividad bronquial inmunológica en perros y ovejas con *Ascaris suum*<sup>9,43</sup>.

Existen diversos modelos no inmunológicos capaces de generar inflamación inespecífica de las vías aéreas e hiperreactividad bronquial, entre los que se puede enumerar a la exposición de cobayos a diisocianato de tolueno que representa un excelente modelo de asma ocupacional<sup>41</sup>. Ciertas infecciones virales son capaces de generar hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas<sup>40</sup>; asimismo la infusión intravenosa o la inhalación de endotoxinas bacterianas se ha utilizado como modelo experimental de asma<sup>35</sup>. Por otra parte, la inhalación de la fracción C5a-des-Arg del complemento es capaz de generar un potente proceso de inflamación concomitante a hiperreactividad de las vías aéreas<sup>36</sup>. Finalmente, la inhalación de

contaminantes oxidantes como el ozono, el dióxido de nitrógeno, el dióxido de azufre, así como el humo de cigarro generan hiperreactividad de las vías aéreas en diversas especies como el humano, el perro y el cobayo <sup>41</sup>. De dichos agentes irritantes el O<sub>3</sub> ha sido el más ampliamente utilizado como modelo experimental de hiperreactividad ya que la inhalación de altas concentraciones desencadena de manera reproducible la mayoría de los procesos implicados en la hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas presentes en el asma bronquial<sup>64</sup>.

#### *Mecanismos de la hiperreactividad producida por ozono*

Existen varias teorías que tratan de explicar los mecanismos involucrados en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por O<sub>3</sub>, destacando entre ellos el daño del epitelio de las vías aéreas, la liberación de mediadores químicos por la célula cebada, la generación de un proceso inflamatorio, la producción de reflejo vagal, la estimulación del sistema contráctil no adrenérgico no colinérgico (NANC), y el incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico.

#### *Daño epitelial*

Se ha postulado que el O<sub>3</sub> produce daño del epitelio de las vías aéreas mediante la liberación de radicales superóxidos, que causan la oxidación de los componentes de la membrana celular ocasionando lesiones morfológicas y funcionales del epitelio de las vías aéreas<sup>32,59</sup>. Se ha demostrado que la ausencia del epitelio respiratorio provoca que el músculo liso traqueobronquial responda exageradamente a diversos agonistas constrictores, es decir, provoca hiperreactividad de las vías aéreas<sup>3,29,51</sup>. Este incremento en la sensibilidad del músculo liso se debe principalmente a que el epitelio de las vías aéreas produce un factor de relajación, probablemente PGE<sub>2</sub> y, cuando este epitelio es lesionado, ocasiona que las respuestas a los agonistas constrictores sean de mayor intensidad<sup>10,12</sup>. Por otra parte, diversos autores mencionan que la alteración que

el  $O_3$  desencadena en el epitelio es un incremento en su permeabilidad, lo cual facilita la penetración de mediadores químicos broncoconstrictores, perdiéndose la función de barrera anatómica por parte de las células epiteliales de las vías aéreas<sup>7,57</sup>.

Recientemente se ha descrito que el  $O_3$  es capaz de incrementar la liberación de diversas citocinas proinflamatorias provenientes de las células epiteliales que recubren a las vías aéreas. Entre ellas se encuentran las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8; factores de crecimiento GM-CSF, citotoxinas como el TNF, y el interferón IFN- $\gamma$ , que entre otros efectos generan adhesión, diferenciación, atracción, y activación de células inflamatorias<sup>17b</sup>.

#### Inflamación de las vías aéreas

El daño celular epitelial de las vías aéreas desencadena una cascada de eventos que resultan en la infiltración neutrofílica y la hiperreactividad de las vías aéreas, pero aún existe controversia sobre si ambos fenómenos son independientes o tienen una relación causa-efecto.

La presencia de un proceso inflamatorio inducido por la exposición a  $O_3$  ha sido bien documentada en todas las especies estudiadas. El  $O_3$  induce la degranulación de células cebadas, con la liberación subsecuente de mediadores químicos proinflamatorios preformados como la histamina<sup>65</sup>, y de nueva formación como las prostaglandinas (PGs) (principalmente  $PGD_2$ ), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs) ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$  y  $LTE_4$ ), adenosina y factor activador de plaquetas (PAF)<sup>50,19</sup>, todos ellos capaces de producir hiperreactividad. Además, el proceso inflamatorio ocasionado por la inhalación del  $O_3$  presenta células como los neutrófilos y macrófagos<sup>53</sup>, los cuales también liberan algunos mediadores químicos como  $LTB_4$ ,  $LTC_4$  y PAF, pudiendo así perpetuar la hiperreactividad.

Diversos estudios han sugerido que los metabolitos del ácido araquidónico juegan un papel preponderante en la hiperreactividad inducida por el  $O_3$ , donde la principal fuente

de dichos mediadores son precisamente las células inflamatorias del pulmón.

La participación de los productos derivados de la vía de la cicloxigenasa en la hiperreactividad generada por el  $O_3$  es controvertible ya que únicamente existe un trabajo en el que se halla que la inhibición de la producción de prostaglandinas (PGs) con indometacina previene la hiperreactividad inducida por  $O_3$  en el perro<sup>58</sup>. En contraste un gran número de publicaciones recientes mencionan que las PGs son ineficaces para desencadenar un incremento en la respuesta de las vías aéreas del cobayo y el perro<sup>32,44,73</sup>.

En 1985 Aizawa y col. demuestran la importancia de los tromboxanos en la hiperreactividad generada por el  $O_3$  en perros<sup>2</sup>, aunque en investigaciones posteriores, realizadas por el mismo grupo, se descarta el papel de los TXs en el incremento en la respuesta broncoconstrictora generada por el  $O_3$ <sup>38a, 39</sup>.

Finalmente, Fourke y col. en 1991 observan que la exposición aguda a  $O_3$  (0.5 ppm, 2h) no incrementa los niveles de PGs, ni TXs en el LBA recuperado de perros hiperreactivos, lo que sugiere que los mediadores derivados de la vía de la cicloxigenasa no están involucrados en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el  $O_3$ <sup>21</sup>.

Por otra parte, se ha corroborado en diversas publicaciones el papel preponderante de los leucotrienos en la hiperreactividad generada por el  $O_3$  en el cobayo, utilizando diversos inhibidores específicos de su precursor la 5-lipoxigenasa<sup>44,52</sup>. En contraste, Yeadon en 1992 encuentra que la inhibición específica de la 5-lipoxigenasa no disminuye la respuesta del cobayo generada por el  $O_3$ <sup>73</sup>.

#### Alteraciones neurales

Varios autores mencionan que el incremento en la reactividad de las vías aéreas al  $O_3$  es consecuencia de la disrupción epitelial, la cual expone a las terminaciones nerviosas sensoriales colinérgicas que son así fácilmente estimuladas

por agentes exógenos o endógenos, lo que genera la liberación de acetilcolina (ACh) y finalmente broncoconstricción por reflejo vagal, tanto en humanos<sup>23</sup>, como en perros<sup>45</sup>, mientras que en cobayos este mecanismo no parece ser importante en el desarrollo de hiperreactividad por O<sub>3</sub><sup>25</sup>.

Recientemente se ha descrito que el O<sub>3</sub> genera hiperreactividad por estimulación del sistema excitatorio no adrenérgico no colinérgico en cobayos, evaluada a través de la broncoconstricción mediada por la liberación de taquicininas endógenas por estimulación antidrómica de los nervios vagos<sup>15</sup>. El sistema NANC presenta una porción excitatoria (broncoconstrictora) y una inhibitoria (broncodilatadora), cuya existencia está bien documentada tanto en humanos<sup>4</sup>, como en cobayos<sup>27</sup>.

El sistema excitatorio NANC es un grupo de fibras aferentes C, no mielinizadas, de origen vagal, cuyos neurotransmisores son las taquicininas; la principal es la sustancia P (SP), un polipéptido de 11 aminoácidos que es capaz de generar contracción del músculo traqueobronquial de manera directa en el cobayo. La actividad contractil producida por este neuropéptido es modulada mediante su degradación por enzimas metalopeptidasas neutras o endopeptidasas neutras (EPN) sintetizadas principalmente por las células epiteliales que recubren a las vías aéreas<sup>66</sup>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen gran cantidad de estudios en animales de laboratorio sobre el papel del  $O_3$  en la producción aguda de hiperreactividad de las vías aéreas. La mayoría de estos estudios utilizan concentraciones que jamás se encuentran en las atmósferas urbanas (3ppm durante 30 min). El  $O_3$  se ha utilizado más como un modelo experimental para el estudio de la hiperreactividad de las vías aéreas, que con el fin de determinar los efectos nocivos que desencadena la contaminación atmosférica por  $O_3$  sobre la salud. Por ello en este trabajo nos propusimos evaluar si la exposición a concentraciones bajas de  $O_3$  es capaz de modificar la respuesta constrictora del músculo liso traqueobronquial.

Por otra parte, en un trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio encontramos que la exposición aguda a 3 ppm de  $O_3$  por una hora en cobayos sanos provocó, 16 a 18 horas después, hiperreactividad *in vitro* a la histamina en las vías aéreas periféricas, mas no en las vías aéreas centrales, así como hiperreactividad *in vivo* a la histamina y al reto antigénico. Estos cambios coincidieron con un aumento de los neutrófilos recuperados en el lavado broncoalveolar (LBA), sugiriendo que existe una relación causa-efecto entre la inflamación neutrofílica y la hiperreactividad de las vías aéreas<sup>15</sup>.

Por lo anterior, este trabajo pretende dilucidar con mayor detalle:

- 1) Si la manifestación de la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por  $O_3$  varía según el fármaco utilizado, caracterizando la respuesta contráctil del músculo liso de las vías aéreas de cobayos sanos y expuestos a  $O_3$  a tres agonistas constrictores: acetilcolina, histamina y sustancia P (ésta última poco usada como herramienta farmacológica en la hiperreactividad inducida por el  $O_3$ ), y 2) si el grado de hiperreactividad inducida por diversas concentraciones de  $O_3$  correlaciona con el incremento en algún tipo de célula inflamatoria en el LBA.



## HIPOTESIS

1. La inhalación de bajas concentraciones de  $O_3$  durante 4 horas provoca que las vías aéreas muestren mayor reactividad a la estimulación por diversos agentes constrictores del músculo liso traqueobronquial, es decir, desencadena hiperreactividad.
2. El grado de hiperreactividad correlaciona en forma directa con la concentración de  $O_3$  inhalada.
3. El grado de hiperreactividad de las vías aéreas *in vivo* correlaciona directamente con el incremento en el número de uno o varios tipos de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

### 1. Caracterización de la reactividad de las vías aéreas

Realizar curvas dosis-respuesta *in vivo* administrando tres diferentes agonistas constrictores (acetilcolina, histamina y sustancia P) por vía intravenosa a cobayos sanos criados en un ambiente con aire filtrado libre de  $O_3$ .

### 2. Evaluación del efecto del ozono

2a. Determinar si la inhalación de diferentes concentraciones de  $O_3$  durante 4 horas provoca hiperreactividad a los agonistas antes mencionados.

2b. Correlacionar la reactividad de las vías aéreas con la concentración de exposición a  $O_3$ .

### 3. Evaluación del papel de la inflamación.

3a. Practicar un lavado broncoalveolar (LBA) a todos los animales estudiados en los puntos 1 y 2a al finalizar la curva dosis-respuesta, con el objeto de determinar la cuenta total y diferencial de las células recuperadas.

3b. Correlacionar cada uno de los tipos celulares recuperados en el lavado broncoalveolar con el grado de reactividad de las vías aéreas del mismo animal.

## MATERIAL Y METODOS

### *Animales*

Se emplearon cobayos machos cepa Hartley, con un peso entre 500 y 700 g, alimentados *ad libitum*, y criados en condiciones ambientales libres de O<sub>3</sub> mediante el uso de un filtro de aire (Heaven, AllerMed Corp., TX, EUA).

### *Exposición a ozono*

Los cobayos fueron expuestos a diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> (0.3, 0.6, 1.2 ppm) por un periodo de 4 h. Estas concentraciones fueron seleccionadas para abarcar las que suelen encontrarse en la contaminación atmosférica. Como grupo control se usaron cobayos no expuestos a O<sub>3</sub>. El O<sub>3</sub> fue producido haciendo pasar un flujo constante de aire a través de un generador de O<sub>3</sub> (Puraqua-V, Purificadores Eléctricos por Ozono, México DF), y transferido directamente a una cámara de acrílico (60 x 46 x 22 cm). Las concentraciones de O<sub>3</sub> fueron estabilizadas antes de colocar a los animales en la cámara y se mantuvieron en los niveles requeridos regulando el voltaje del generador de O<sub>3</sub>. La concentración de este gas dentro de la cámara se vigiló constantemente con un analizador ultravioleta de O<sub>3</sub> (1008 PC, Dasibi Environ. Corp., Glendale, CA, EUA). El estudio de los animales expuestos a O<sub>3</sub> se realizó 16 a 18 horas después de la exposición, ya que se ha demostrado que este periodo es suficiente para que se manifieste hiperreactividad a acetilcolina e histamina en cobayos<sup>53,15</sup>

### *Medición de la reactividad de las vías aéreas*

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg) por vía intraperitoneal y mantenidos bajo anestesia administrándoles 9 mg/kg de pentobarbital por vía intravenosa cada hora. A todos los cobayos se les administraron 0.06 mg/kg de bromuro de pancuronio para suprimir los movimientos respiratorios espontáneos. Se diseccionaron y canularon la arteria carótida izquierda y la vena yugular derecha. A través de la carótida se registró la presión arterial con un transductor

de presión (Beckman 4-327-0129) y por la yugular se <sup>12</sup> administraron los fármacos. De igual manera, la tráquea se canuló para ventilar mecánicamente a los cobayos con un miniventilador (50-1700, Harvard Apparatus Ltd., Bournemouth, Inglaterra), a un volumen corriente de 10 ml/kg y una frecuencia respiratoria de 48 respiraciones/min. La broncoconstricción desarrollada por los animales en respuesta al agonista se midió a través de un transductor de broncospasmo (Ugo Basile, mod. 7020, Comerio, Italia) conectado a una vía colateral de la sonda endotraqueal. La broncoconstricción se evaluó como porcentaje de la obstrucción máxima obtenida con la oclusión total y transitoria de la sonda endotraqueal. Se construyeron curvas dosis-respuesta no acumulativas mediante la aplicación intravenosa de dosis crecientes de los fármacos acetilcolina (ACh) (0.032 a 3.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), histamina (0.01 a 1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), y sustancia P (SP) (0.0056 a 1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Es importante mencionar que únicamente se realizó una curva dosis-respuesta a uno de los agonistas anteriormente mencionados en cada cobayo.

#### *Lavado broncoalveolar*

A todos los animales se les practicó un LBA una vez terminada la curva dosis-respuesta al agonista utilizado. A través de la sonda endotraqueal se introdujeron 10 ml de solución salina a 37°C y, al cabo de un minuto, se aspiró suavemente hasta recuperar el mayor volumen posible de solución. Esta maniobra se repitió una vez más. El líquido recuperado en ambas ocasiones fue mezclado homogéneamente para posteriormente centrifugarlo a 500 g a 4°C. Del paquete celular obtenido se realizó un frotis que fue teñido con hematoxilina-eosina para obtener la cuenta diferencial de las células. Asimismo, se realizó tinción supravital con azul de tripano para determinar la viabilidad de las células recuperadas en el LBA, así como también se contabilizó el número total de células por mililitro de LBA utilizando para ello un hemocitómetro de Neubauer.

### *Fármacos*

El bromuro de acetilcolina, el diclorhidrato de histamina y el acetato de sustancia P (Sigma Chem. Co., MI, EUA) fueron disueltos en solución salina al 0.9%.

### *Análisis estadístico*

Los resultados fueron expresados como el logaritmo negativo de la Dosis Efectiva 50% (-log DE50%), es decir, la dosis del agonista a la cual se obtuvo el 50% de la respuesta máxima. Cabe señalar que a valores más negativos del -log DE50%, menor concentración requerida del agonista y, por lo tanto, mayor sensibilidad de las vías aéreas. La DE50% se calculó mediante análisis de regresión lineal con los datos previamente transformados a unidades probabilísticas. A los resultados se les realizó análisis de varianza de una vía y prueba de Dunnett. Para buscar posibles asociaciones entre dos eventos se emplearon análisis de regresión de línea recta y análisis de correlación de Pearson. El nivel de significancia se fijó en valores de  $p < 0.05$  a nivel bimarginal. En el texto y las ilustraciones los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

### *Curvas a acetilcolina*

La exposición aguda a  $O_3$  no modificó significativamente la reactividad de las vías aéreas a la ACh en ninguno de los grupos expuestos al  $O_3$  (tabla 1, fig. 1, fig. 2). En los cobayos expuestos a la concentración más alta, aunque la curva dosis-respuesta se desplazó a la izquierda, esta diferencia careció de significancia estadística. Por otra parte, no se halló correlación directa entre la concentración de  $O_3$  y la reactividad a la ACh ( $r=0.35$ , fig.3).

### *Lavado broncoalveolar (ACh)*

La cuenta total celular recuperada en el LBA de los cobayos que recibieron ACh, no se incrementó en aquellos que fueron expuestos a las diversas concentraciones de  $O_3$  (fig. 4). Al analizar todos los grupos en conjunto, se encontró que la concentración inhalada de  $O_3$  no modifica el número de células totales recuperadas en el LBA, es decir, no hubo correlación entre dichas variables ( $r=0.12$ ) como tampoco se asoció con el  $-\log DE50\%$  ( $r=0.13$ ).

En relación a la cuenta celular diferencial, se observó que las diversas estirpes celulares estudiadas no se ven modificadas de manera significativa. Aun cuando existió una tendencia a recuperar mayor número de neutrófilos en los LBA provenientes de los cobayos expuestos a las diversas concentraciones de  $O_3$  (fig. 4), la dispersión en los datos obtenidos no permitió que se observaran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al analizar en conjunto todos los grupos experimentales se observó que el incremento en la recuperación de neutrófilos en el LBA se correlaciona significativamente con la concentración de  $O_3$  inhalada ( $r=0.38$ ,  $p<0.05$ , fig. 5), no así con la reactividad a la ACh ( $r=0.17$ ). Los linfocitos, los eosinófilos y los macrófagos no mostraron variación significativa (fig. 4).

Tabla 1. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de ozono sobre la reactividad de las vías aéreas a la acetilcolina.

Ozono (ppm)	n	-LogDE50% prom. $\pm$ e.e.	Significancia p*
Control	6	2.7675 $\pm$ 0.0456	
0.3	7	2.8152 $\pm$ 0.0860	NS
0.6	8	2.9024 $\pm$ 0.1194	NS
1.2	6	2.9878 $\pm$ 0.0349	NS

\* Diferencia estadística respecto al control (prueba de Dunnett).

NS=no significativa.

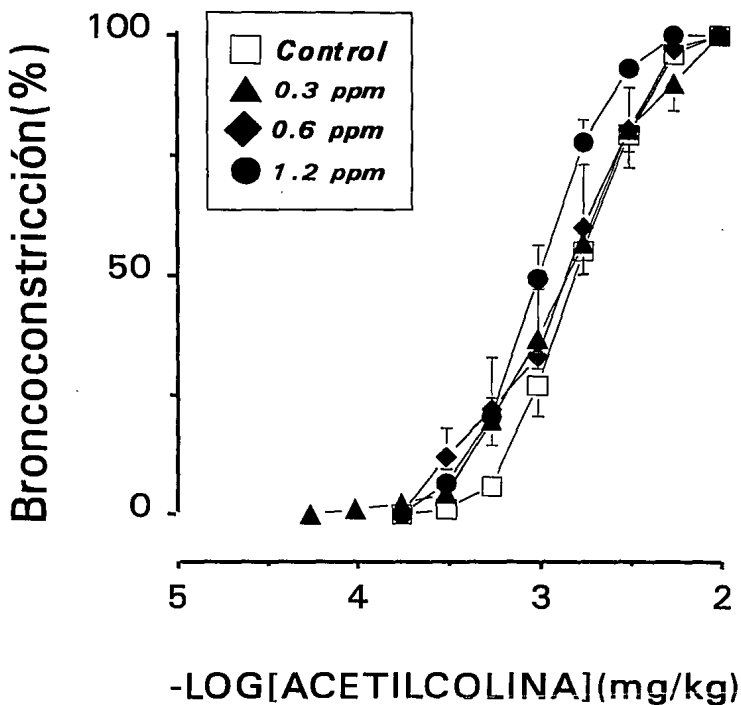


Figura 1.

Curva no acumulativa a ACh. Efecto de la exposición aguda a diversas concentraciones de ozono en la reactividad de las vías aéreas in vivo de cobayos criados en condiciones libres de ozono



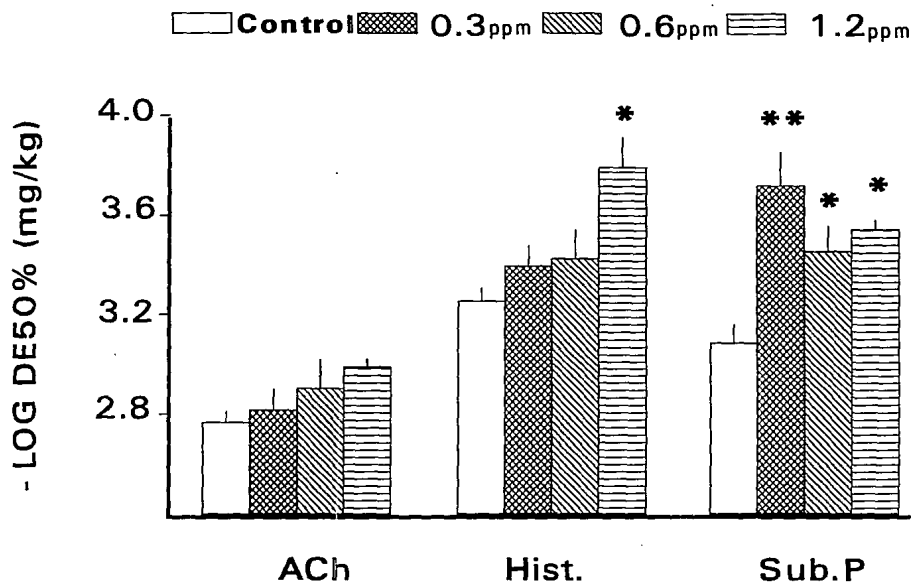
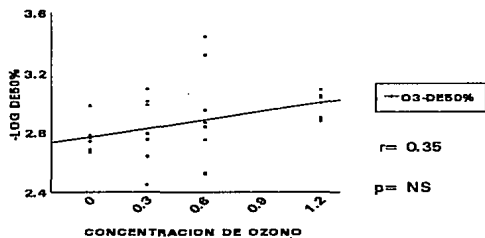
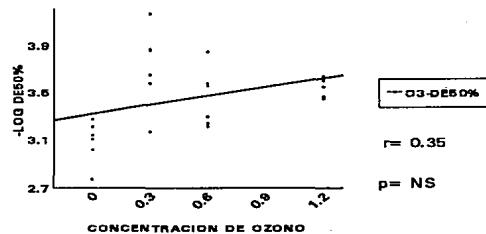


Figura 2. Analisis estadistico del efecto de la exposicion a ozono sobre la reactividad de las vias aereas del cobayo a diversos agonistas. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

**CORRELACION OZONO-DE50%  
ACETILCOLINA**



**CORRELACION OZONO-DE50%  
SUSTANCIA P**



**CORRELACION OZONO-DE50%  
HISTAMINA**

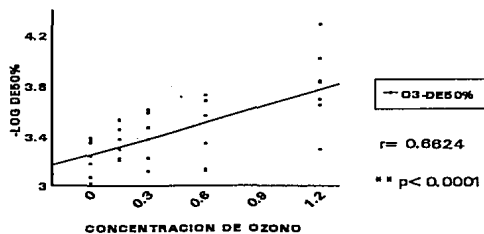


Figura 3. Asociación entre la concentración de ozono inhalada y la reactividad de las vías aéreas a ACh, Sub. P e histamina

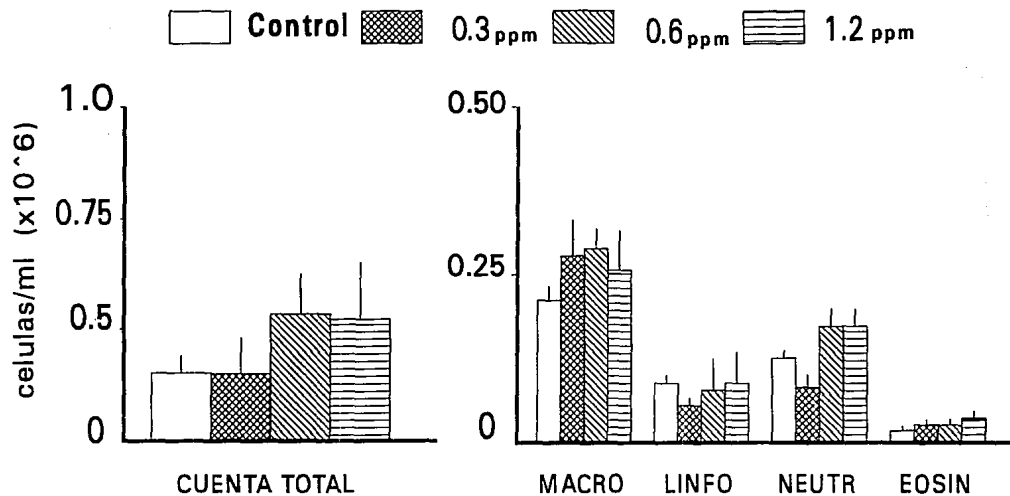


Figura 4.

Conteo celular total y diferencial del LBA obtenido post-curva a ACh de cobayos expuestos a diversas concentraciones de ozono. Las barras representan valores promedio y las líneas verticales el error estandar. Ninguna comparacion mostro diferencias estadisticamente significativas.

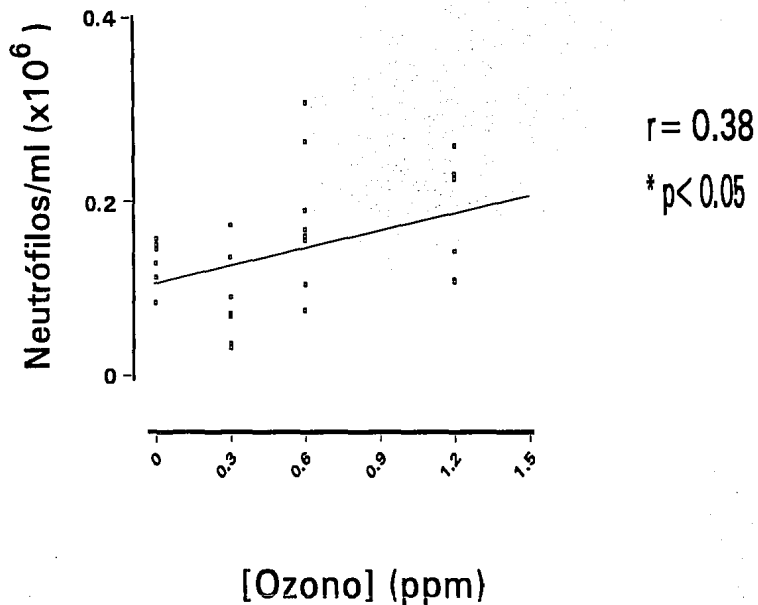


Figura 5.  
Correlación entre la concentración de ozono inhalada y el número total de neutrófilos recuperados en el LBA post-curva a ACh.

### *Curvas a histamina*

La exposición aguda a  $O_3$  incrementó significativamente la reactividad de las vías aéreas a la histamina en el grupo expuesto a la concentración más alta, es decir, a 1.2 ppm de  $O_3$  ( $p < 0.01$ , tabla 2, fig. 2 y 6.). En los cobayos expuestos a concentraciones más bajas, aunque las curvas dosis-respuesta a la histamina se desplazaron ligeramente a la izquierda, estas diferencias carecieron de significancia estadística (fig. 2, tabla 2). Sin embargo, se encontró una correlación directa entre la concentración de  $O_3$  y la reactividad a la histamina ( $r = 0.66$ ,  $p < 0.0003$ , fig. 3).

### *Lavado broncoalveolar (Histamina)*

El número de células totales recuperadas en el LBA se incrementó en todos los grupos de cobayos expuestos a  $O_3$ , aunque se observó una gran dispersión por lo que este incremento sólo alcanzó significancia estadística a la concentración de 1.2 ppm de  $O_3$  ( $p < 0.05$ , fig. 7). Al analizar todos los grupos en conjunto, se encontró que el número de células totales tuvo correlación tanto con la concentración de  $O_3$  ( $r = 0.37$ ,  $p < 0.05$ , fig. 8A) como con el  $-\log DE50\%$  ( $r = 0.37$ ,  $p < 0.05$ , fig. 8B).

En relación con la cuenta celular diferencial, se observó que el número absoluto de neutrófilos se incrementó significativamente en los grupos expuestos a 0.3 ppm ( $p < 0.01$ ) y a 1.2 ppm ( $p < 0.05$ ), mas no hubo correlación entre la población neutrofílica y la concentración de  $O_3$  ( $r = 0.15$ ) o la reactividad a la histamina ( $-\log DE50\%$ ) ( $r = 0.22$ ). La población de linfocitos también tuvo tendencia a incrementarse con la exposición a  $O_3$ , pero sólo alcanzó significancia a la concentración de 0.3 ppm ( $p < 0.05$ ). Los eosinófilos y los macrófagos no mostraron variación significativa (fig. 7).

Tabla 2. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de ozono sobre la reactividad de las vías aéreas a la histamina.

Ozono (ppm)	n	-LogDE50% prom. $\pm$ e.e.	Significancia p*
Control	8	3.2525 $\pm$ 0.0533	
0.3	6	3.4011 $\pm$ 0.0815	NS
0.6	6	3.4317 $\pm$ 0.1106	NS
1.2	7	3.7909 $\pm$ 0.1196	p<0.01

\* Diferencia estadística respecto al control (prueba de Dunnett).  
NS=no significativa.

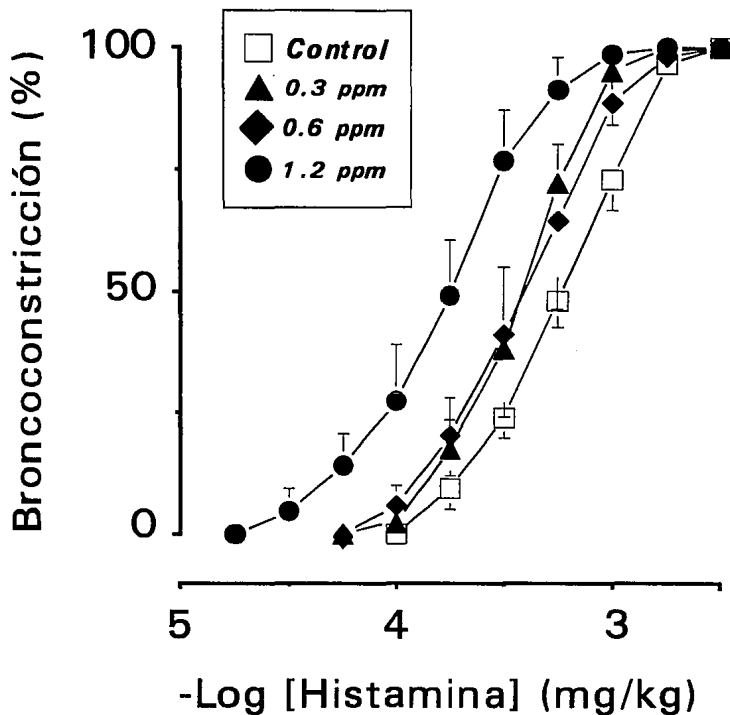


Figura 6.

Curva no acumulativa a histamina. Efecto de la exposición a diversas concentraciones de ozono en la reactividad de las vías aéreas in vivo de cobayos criados en condiciones libres de ozono

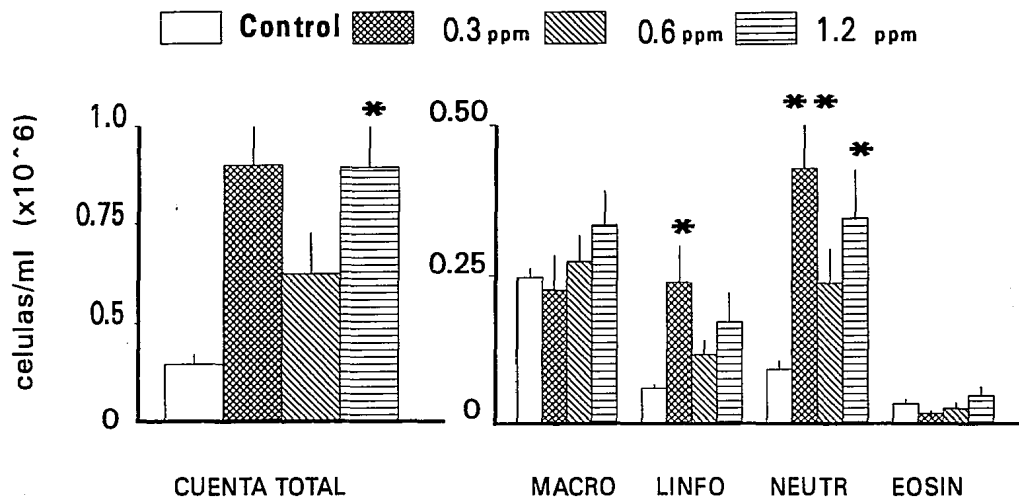


Figura 7.

Cuenta celular total y diferencial del LBA obtenido post-curva a histamina de cobayos expuestos a diversas concentraciones de ozono. Las barras representan los valores promedio y las líneas verticales el error estandar. \*\*p < 0.01, \*p < 0.5.



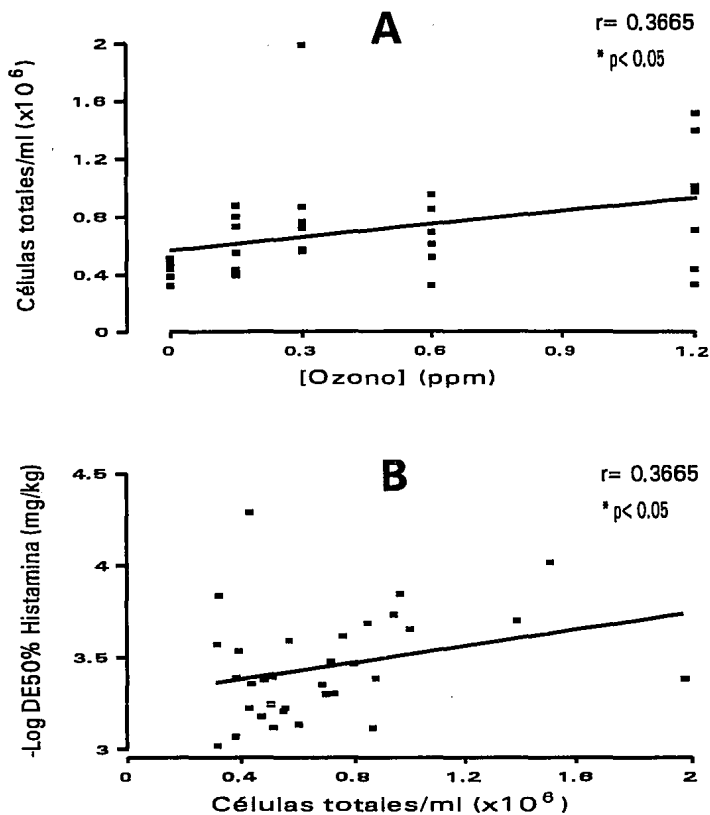


Figura 8.

A: Correlación entre la concentración de ozono inhalada y el número total de células recuperadas en el LBA post-curva a histamina.

B: Correlación entre la cuenta celular total y la reactividad de las vías aéreas a histamina por exposición a ozono.

### *Curvas a sustancia P.*

La exposición aguda a  $O_3$  incrementó significativamente la reactividad de las vías aéreas a la SP en todos los grupos expuestos al  $O_3$  desde la concentración más baja evaluada, es decir para 0.3 ppm ( $p < 0.01$ , fig. 2 y 9). Dicho incremento en la respuesta al agonista persistió en los cobayos expuestos tanto a 0.6 ppm, como en los expuestos a 1.2 ppm ( $p < 0.05$ , tabla 3, fig. 2). La hiperreactividad observada para la SP no fue determinada por la concentración de  $O_3$  inhalada ( $r = 0.35$ , fig. 3).

### *Lavado broncoalveolar (SP)*

El número absoluto de células recuperadas en el LBA no se modificó en los cobayos expuestos a las diversas concentraciones de  $O_3$  (fig. 10). Al analizar todos los grupos en conjunto, se encontró que la concentración de  $O_3$  inhalada no influye de manera directa en el número de células totales recuperadas en el LBA, es decir no hubo correlación entre dichas variables ( $r = 0.31$ ), así como tampoco se correlacionó con la respuesta de las vías aéreas al péptido ( $r = 0.18$ ). La diversas estirpes celulares estudiadas no se ven modificadas después de la realización de la curva farmacológica a la SP (fig. 10). Sin embargo el número de neutrófilos recuperados en el LBA presentó una tendencia a incrementarse conforme mayor era la exposición al  $O_3$ , sin que en ningún caso fueran estadísticamente superiores al control. Tampoco se observaron correlaciones entre la concentración de  $O_3$  inhalada, la reactividad de las vías aéreas y alguna de las distintas células presentes en el LBA (fig. 10).

Tabla 3. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de ozono sobre la reactividad de las vías aéreas a la sustancia P.

Ozono (ppm)	n	-LogDE50% prom. $\pm$ e.e.	Significancia p*
Control	6	3.0869 $\pm$ 0.0726	
0.3	6	3.7176 $\pm$ 0.1365	p<0.01
0.6	6	3.4574 $\pm$ 0.1012	p<0.05
1.2	5	3.5410 $\pm$ 0.03848	p<0.05

\* Diferencia estadística respecto al control (prueba de Dunnett).

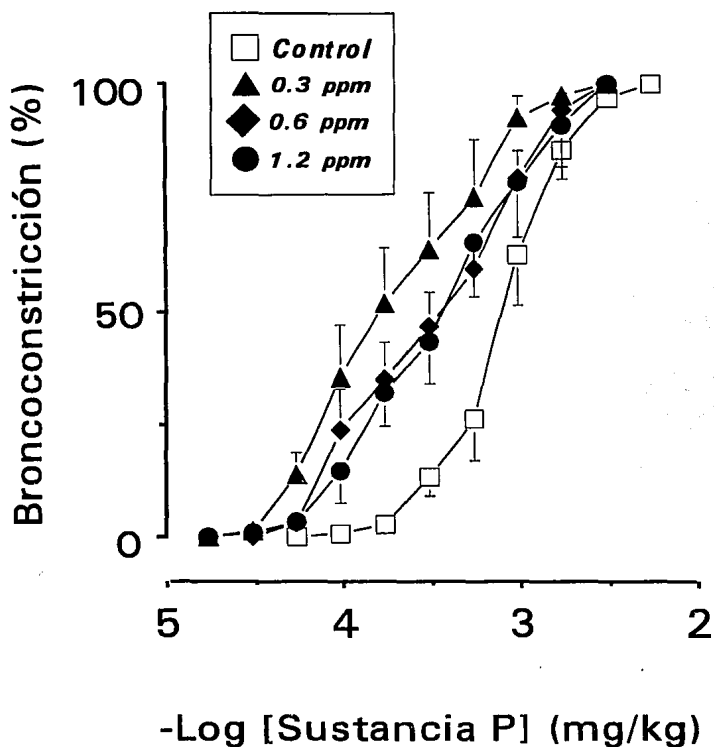


Figura 9.

Curva no acumulativa a sustancia P. Efecto de la exposición a diversas concentraciones de ozono en la reactividad de las vías aéreas in vivo de cobayos criados en condiciones libres de ozono

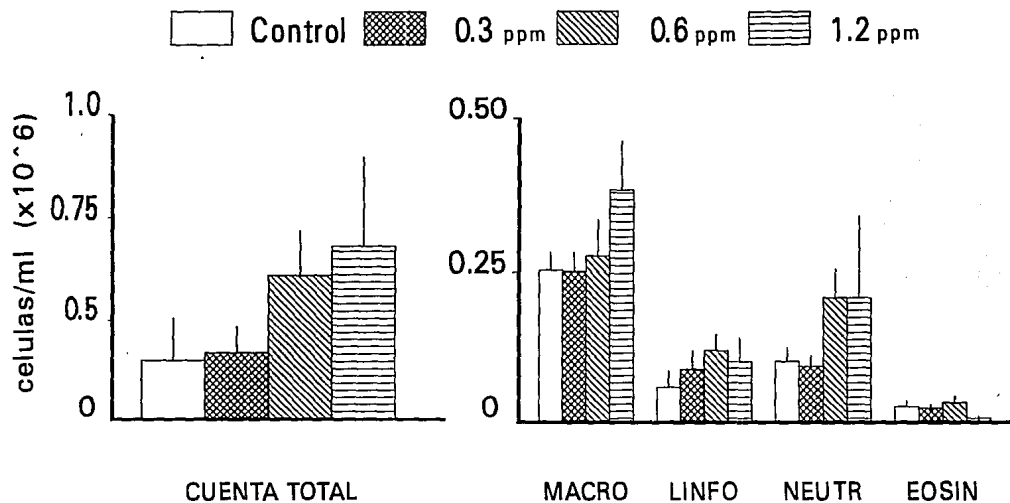


Figura 10.

Cuenta celular total y diferencial del LBA obtenido post-curva a SP de cobayos expuestos a diversas concentraciones de ozono. Las barras representan los valores promedio y las líneas verticales el error estandar. Ninguna comparación mostro diferencias estadisticamente significativas.

## DISCUSION

La hiperreactividad de las vías aéreas es una de las alteraciones fisiológicas más importantes asociadas a la exposición a O<sub>3</sub>. En este estudio encontramos que la exposición aguda a O<sub>3</sub> es capaz de desencadenar un incremento en la respuesta de las vías aéreas del cobayo, cuya expresión varía de acuerdo con fármaco utilizado.

### REACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS A LA ACETILCOLINA

En este estudio se observó que la respuesta de las vías aéreas a la ACh no presentó modificaciones por la inhalación de O<sub>3</sub>, ni siquiera para la exposición a 1.2 ppm, ya que la diferencia en las respuestas fue de baja magnitud en los grupos experimentales. Tampoco se observó correlación entre el grado de reactividad a la ACh y la concentración de O<sub>3</sub> inhalada en todos los grupos evaluados. De esta manera, para la respuesta *in vivo* a ACh concluimos que la inhalación de O<sub>3</sub> (0.3 a 1.2 ppm) no altera la fisiología contráctil colinérgica de las vías aéreas, y que no existe dependencia entre la respuesta broncoconstrictora y la concentración inhalada. Estos resultados concuerdan con los datos publicados en la literatura, donde se observa que la reactividad de las vías aéreas a la ACh solamente se ve alterada en cobayos expuestos a altas concentraciones de O<sub>3</sub>. En 1985 Murlas y col. observa que la exposición a 3 ppm de O<sub>3</sub> por 2 h genera hiperreactividad a la ACh *in vivo* en cobayos y que ésta se manifiesta desde las 2 h postexposición y persiste hasta 48 h después, alcanzando su máxima expresión entre las 16 y las 18 h<sup>53</sup>. Lew y col. corroboran dicha observación al hallar hiperreactividad a la ACh por vía inhalada en cobayos expuestos durante 2h a 3 ppm de O<sub>3</sub>, así como un incremento importante en la permeabilidad del epitelio<sup>46</sup>. Acorde con nuestros resultados, Wiester y col. en 1990 observaron en cobayos que la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> durante 2 h incrementa la reactividad de las vías aéreas a la histamina por vía

inhalatoria, mientras que este fenómeno no se observo para la administración i.v. de ACh<sup>72</sup>.

En humanos muchos autores han adjudicado mecanismos colinérgicos a la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por O<sub>3</sub><sup>23,34</sup>, mientras que en animales, otros estudios han dejado entrever que el incremento en la resistencia pulmonar por O<sub>3</sub> esta dada por mecanismos que no se hallan involucrados con receptores colinérgicos<sup>6</sup>, y que únicamente la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> o más, desencadena alteraciones en la regulación colinérgica en las vías aéreas del perro<sup>22</sup>. Recientemente dicha observación fue descrita también para la rata por Tepper y col. quienes hallan que la hiperreactividad de las vías aéreas a ACh i.v., únicamente se presenta para concentraciones de O<sub>3</sub> mayores a 1 ppm<sup>68</sup>.

Buscando una probable explicación a la hiperreactividad generada por el O<sub>3</sub> en cobayos y en humanos, Gordon y col. en 1981 estudiaron la inhibición de la acetilcolinesterasa por O<sub>3</sub> en diversos tejidos como el pulmón, cerebro y diafragma del cobayo. La actividad de la acetilcolinesterasa disminuyó cerca de un 17% cuando la exposición fue a 0.1 ppm, sin embargo a una exposición mayor de 0.8 ppm la inhibición no se modificó. La falta de una clara relación concentración-inhibición descartó el argumento de que la disminución en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa genera la acumulación de altas concentraciones de ACh en el músculo liso bronquial, y de este modo da lugar al aumento en la reactividad bronquial consecuente a la exposición de O<sub>3</sub><sup>26</sup>; o bien de que este fenómeno fuese dependiente de la concentración, lo cual concuerda con los hallazgos obtenidos en esta investigación donde no hubo correlación entre la reactividad de las vías aéreas a la ACh y la concentración de O<sub>3</sub> inhalada.

## REACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS A LA HISTAMINA

El resultado de los experimentos realizados muestra que la exposición al  $O_3$  desencadenó hiperreactividad únicamente a la concentración más alta utilizada, mientras que concentraciones menores de  $O_3$  no causaron modificación significativa de la reactividad traqueobronquial. Este hallazgo nos permite sugerir que se requieren concentraciones muy superiores a las de la contaminación atmosférica urbana para ocasionar hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina, puesto que en la Ciudad de México la contaminación por  $O_3$  suele no rebasar 0.4 ppm<sup>60</sup>. Sin embargo al analizar los datos recabados para la histamina en forma conjunta, se observó que existió correlación directa entre la concentración de  $O_3$  inhalada y el grado de reactividad de las vías aéreas, lo que sugiere que este fenómeno es dependiente de la concentración inhalada de  $O_3$ , y que desde concentraciones bajas de  $O_3$  se manifiesta la tendencia a la producción de hiperreactividad.

Existen diversos trabajos en los cuales se ha observado incremento en la reactividad a la histamina generado por el  $O_3$ . Easton y Murphy en 1967 fueron los primeros en demostrar que únicamente la inhalación de altas concentraciones de  $O_3$  (1 a 7 ppm) es capaz de incrementar la respuesta de las vías aéreas al agonista<sup>18</sup>, lo cual concuerda con los hallazgos obtenidos en nuestro estudio. De igual manera Gordon y Admur<sup>24</sup> en 1980, reportan que, en cobayos expuestos a concentraciones crecientes de  $O_3$  (0.1, 0.2, 0.4, o 0.8 ppm de  $O_3$ ), hay hiperreactividad a la histamina únicamente a la concentración de 0.8 ppm, pero concluyen que esta respuesta es dependiente de la concentración utilizada. Esto nos permite pensar que la concentración umbral para la presentación de hiperreactividad a la histamina debe ser mayor de 0.8 ppm de  $O_3$  y que el incremento en la respuesta de las vías aéreas desencadenado por la exposición al  $O_3$  es totalmente dependiente de la concentración inhalada.

Estas observaciones nos permiten sugerir que probablemente la hiperreactividad inducida por  $O_3$  no se debe a alteraciones



morfológicas del músculo liso en sí mismo, ya que la acción tanto de la ACh como de la histamina es directamente sobre receptores membranales, sino que probablemente son otras alteraciones las responsables de la hiperreactividad de las vías aéreas generada por el O<sub>3</sub>, como pueden ser efectos pre y post sinápticos<sup>37</sup>, mecanismos neurales reflejos y la liberación de mediadores inflamatorios, como se propone en este estudio.

## REACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS A LA SUSTANCIA P

Al evaluar el efecto del  $O_3$  sobre la respuesta contractil a la sustancia P, se encontró un gran incremento en la reactividad de las vías aéreas al fármaco desde la concentración más baja evaluada, es decir 0.3 ppm de  $O_3$ , concentración que se alcanza en la Cd. de México. La hiperreactividad desencadenada para la sustancia P se comportó de manera cualitativa como un fenómeno "todo o nada"; es decir, una vez rebasada la concentración umbral de  $O_3$ , aunque el animal fuese expuesto a una concentración mayor, la respuesta broncoconstrictora no fue de mayor intensidad, lo que nos permite sugerir que la exposición a concentraciones ambientales (contaminación) de  $O_3$ , genera hiperreactividad de las vías aéreas a la sustancia P en el cobayo.

Hasta la fecha este estudio constituye el primer trabajo en el que se reporta hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo a una concentración tan baja como 0.3 ppm, ya que existen muy pocas investigaciones en las cuales se halla utilizado a la sustancia P como herramienta farmacológica para evaluar la hiperreactividad inducida por  $O_3$  <sup>69</sup>.

En contraste con los datos hallados en esta investigación, Yeadon y col. en 1992 reportan que la exposición a 3 ppm de  $O_3$  durante 30 min genera hiperreactividad a histamina, ACh, serotonina y sustancia P en cobayos, siempre y cuando la vía de administración del fármaco sea inhalada, ya que si la vía es i.v. no observa incremento de la reactividad de las vías aéreas a dichos fármacos <sup>73</sup>.

En un estudio reciente Murlas y col. <sup>56</sup> observaron que la inhalación de  $O_3$  (3 ppm, 2h) induce hiperreactividad *in vitro* a sustancia P en músculo liso traqueal de cobayos que presentaron hiperreactividad muscarínica *in vivo*. En un trabajo posterior este mismo grupo de investigadores demostró que el incremento en la reactividad de las vías aéreas se da como consecuencia de la disminución en la actividad de la endopeptidasa neutra (EPN) de las vías aéreas, ya que la hiperreactividad a SP es reversible por inhalación de su

enzima degradadora<sup>55</sup>. Estos estudios sugieren que la hiperreactividad a sustancia P inducida por O<sub>3</sub> puede ser ocasionada por el daño oxidativo a las células epiteliales de las vías aéreas, principales productoras de EPN, ya que el O<sub>3</sub> produce disfunción epitelial en los componentes proteicos citosólicos y de la membrana celular<sup>59</sup>.

Los mecanismos a través de los cuales el O<sub>3</sub> incrementa la sensibilidad de las vías aéreas han sido extensamente estudiados. La tendencia actual sugerida más frecuentemente es proponer a las fibras aferentes sensoriales<sup>15,17,69</sup>, incremento en la liberación de sus mediadores asociados (taquicininas)<sup>73,67,30</sup> y a la disminución en la actividad de la enzima degradadora de las taquicininas<sup>55</sup> como responsables de la hiperreactividad inducida por el O<sub>3</sub>.

Si evaluamos los resultados obtenidos para cada fármaco estudiado podemos observar en primer lugar que, para la ACh, la exposición a O<sub>3</sub>, aun a altas concentraciones (1.2 ppm) es incapaz de desencadenar hiperreactividad de las vías aéreas, mientras que para la histamina únicamente la exposición a 1.2 ppm de O<sub>3</sub> genera hiperreactividad (muy por arriba de los niveles ambientales de O<sub>3</sub>). Finalmente, para la sustancia P se observó que, desde concentraciones ambientales, ya existen alteraciones generadas por la exposición al O<sub>3</sub> que manifiestan hiperreactividad al agonista. Por lo que en conjunto podemos concluir que el O<sub>3</sub> es capaz de desencadenar hiperreactividad de las vías aéreas mediante diversos mecanismos patogénicos que se manifiestan de acuerdo con el fármaco utilizado para evaluar el efecto potenciador del O<sub>3</sub>.

*EFFECTO DEL OZONO SOBRE LAS CELULAS INFLAMATORIAS DEL LBA*

La importancia del papel de la inflamación en la hiperreactividad inducida por el  $O_3$  en diversas especies animales es controvertible. Holtzman y col.<sup>33</sup> encontraron una fuerte asociación entre el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas y el aumento de los polimorfonucleares (PMN) en biopsias pulmonares de perros, 1 h después de ser expuestos a 2 ppm de  $O_3$  durante 2 h. Asimismo, Fabbri y col.<sup>19</sup> hallaron asociación entre el incremento de la respuesta de las vías aéreas y mayor recuperación de células inflamatorias en el LBA de perros. Este mismo grupo demostró posteriormente que la disminución de PMN circulantes con hidroxiaurea inhibe dicha hiperreactividad<sup>58</sup>.

Contrastando con los estudios anteriores, en fecha reciente Li y col.<sup>47</sup> encontraron que, a pesar de evitar la infiltración de PMN en las vías aéreas de perros mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (CD11b/CD18), el incremento de la reactividad inducida por el  $O_3$  persistía. En este mismo sentido, Murlas y Roum<sup>53</sup> estudiaron cobayos expuestos a 3 ppm de  $O_3$  por 2 h, en los cuales demostraron que el incremento en la reactividad de las vías aéreas ocurre antes de la infiltración de PMN a las mismas, por lo que postulan otros mecanismos diferentes a la inflamación como el daño del epitelio de las vías aéreas y la infiltración por células cebadas. Estos mismos investigadores demostraron en un trabajo posterior que la disminución de los PMN circulantes en cobayos con ciclofosfamida no previene la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el  $O_3$ <sup>54</sup>. Todos estos resultados sugieren que la presencia de PMN no es necesaria para que se desencadene la hiperreactividad inducida por  $O_3$  en el cobayo y el perro.

De acuerdo con los resultados observados en los cobayos evaluados con histamina en esta investigación, se halló una relación directa entre la concentración de  $O_3$  y el número de células totales recuperadas en los LBA, lo cual sugiere que el  $O_3$  induce un proceso inflamatorio. Más aun, se demostró que

existía una asociación entre el número de células recuperadas y la reactividad de las vías aéreas a la histamina, lo cual orienta hacia la existencia de una relación causa-efecto. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la hiperreactividad a la histamina inducida por  $O_3$  es debida a la generación de un proceso inflamatorio.

Sin embargo, al intentar esclarecer qué poblaciones celulares estaban involucradas en la generación de la hiperreactividad, encontramos que no hubo asociación de este fenómeno con ninguno de los tipos celulares estudiados. Esto sugiere que el aumento en el número de células inflamatorias no es indispensable para la producción de la hiperreactividad. Una posible explicación para esta discrepancia es que la hiperreactividad esté relacionada principalmente con el grado de activación de algún tipo celular, más que con el número absoluto, como ya ha sido sugerido por otros investigadores<sup>46</sup>.

Las células inflamatorias constituyen un importante componente del sistema de defensa pulmonar, aunque su activación también puede generar la liberación de enzimas proteolíticas, radicales libres de oxígeno y mediadores químicos que generan perpetuación de la inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas.

Los resultados de este estudio muestran grandes discrepancias en cuanto al efecto que el  $O_3$  desencadena en la celularidad recuperada en el LBA de cobayos evaluados con histamina en comparación con los evaluados con ACh y SP; dicha diferencia puede deberse a que el mediador químico utilizado sea el responsable de los cambios celulares observados. Es un hecho conocido que la histamina es un factor quimiotáctico de eosinófilos<sup>46</sup> y neutrófilos<sup>52</sup>, así como es capaz de reclutar leucocitos a los pulmones<sup>13</sup>, aunque su efecto quimiotáctico es inferior al de otros quimioatrayentes<sup>16</sup>. Por otra parte cabe, la posibilidad de que las diferencias en los resultados obtenidos sean ocasionadas por la metodología utilizada para el conteo diferencial, ya que las cuentas celulares

recuperadas tanto para sustancia P como para ACh presentan tendencias de comportamiento muy similares a las observadas para la histamina, pero la dispersión de los datos no permite que se presenten diferencias significativas en estos grupos.

La técnica que se utilizó para la realización del LBA no contempla la normalización del fluido recuperado, y debido a la complejidad en la obtención del líquido broncoalveolar, así como a la existencia de diversas variantes que influyen en la mayor o menor recuperación del mismo (permeabilidad de las vías aéreas, permeabilidad vascular, broncoespasmo, etc.) se desconoce el grado de dilución que cada lavado presentaba, lo cual dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. Por lo que se propone que en lo subsecuente se realicen técnicas para estandarizar los datos obtenidos de los LBA.

En la literatura se mencionan diversas técnicas que se han llegado a utilizar a fin de estandarizar los resultados obtenidos tanto para células como para solutos presentes en el LBA. La adición de azul de metileno al momento de realizar el LBA es una de las maniobras que se ha utilizado como marcador de dilución<sup>5</sup>. Por otra parte, la urea es un marcador de dilución más fisiológico que ha sido ampliamente utilizado para estandarizar la técnica de LBA<sup>39</sup>. Finalmente una manera alternativa de expresar los resultados estandarizados del LBA es a través del cálculo de la cantidad de solutos o células totales por albúmina total recuperada en el LBA ó en su defecto el contenido total de proteínas presentes en el mismo<sup>71</sup>; la inconveniencia de esta última técnica es que cualquier agente que incremente la permeabilidad epitelial de las vías aéreas incrementa la cantidad de proteínas recuperadas en el LBA, como es el caso del O<sub>2</sub><sup>46</sup>.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la exposición a  $O_3$  incrementa la reactividad de las vías aéreas del cobayo y que la manifestación de dicho fenómeno depende del fármaco utilizado para evaluar los mecanismos desencadenados por  $O_3$ .

1. Con ACh no hay hiperreactividad en éste modelo ya que no se modificó, la respuesta broncoconstrictora ni la celularidad de las vías aéreas.

2. Para la histamina el  $O_3$  genera hiperreactividad dependiente de la concentración inhalada y probablemente se presenta como consecuencia de un proceso inflamatorio, sin que se haya podido determinar cuál es el principal tipo celular involucrado.

3. La SP es una herramienta farmacológica más sensible a la exposición al  $O_3$  ya que se observó hiperreactividad de las vías aéreas desde una concentración muy baja, que se alcanza en la Cd. de México, y dicho incremento es independiente de la concentración de  $O_3$  y de la celularidad presente en LBA.

## REFERENCIAS

- 1.- Admur, M., Ugro, V., Underhill, D.: Respiratory response of guinea pig to ozone alone and with sulfur dioxide. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 39: 958-961, 1978.
- 2.- Aizawa H, Chung KF, Leikauf GD, Ueki I, Bethel RA, O'Byrne PM, Hirose T, Nadel JA.: Significance of thromboxane generation in ozone-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *J. Appl. Physiol.* 59: 1918-1923, 1985.
- 3.- Barnes, P. J., Cuss, F. M. Palmer, J. B.: The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. *Br. J. Pharmacol.* 86: 685-691, 1985.
- 4.- Barnes, P.J.: Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1: 242-245, 1986.
- 5.- Baughman, R.P., Bosken, C.H., Loudon, R.G., Hurtubiste, P., Wessler, T.: Quantitation of bronchoalveolar lavage with methylen blue. *Am. Rev. Respir. Dis* 128: 266-270, 1983.



- 6.- Beckett, W., McDonell, W., Hortsman, D., House, D.: Role of the parasympathetic nervous system in acute lung response. *J. Appl. Physiol.* 59: 1879-1885, 1985.
- 7.- Bhalla D.K., Daniels, D.S. Luu, N.T.: Attenuation of Ozone-induced airway Permeability in Rat by Pretreatment with Cylophosphamide, FPL 55712, and Indomethacin. *Am. J. Cell Biol.* 7:73-80, 1992.
- 8.- Bigby TD, Nadel JA.: Asthma. Inflammation: Basic Principles and Clinical correlates, Chapter 44; Second edition. Edited by Gallin JI, Goldstein JM, Snyderman R. Raven Press, Ltd., New York, 1992.
- 9.- Booth B, Patterson, R, Talbot C.: Immediate-type hypersensitivity in dogs; cutaneous, anaphylactic and respiratory responses to *Ascaris*. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 181-189, 1970.
- 10.- Braunstein, G., Lavat, C., Brunelleschi, S., Benveniste, J., Marsac. J. Brink, C.: Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea pig isolated trachea are modulate by epithelial prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Br. J. Pharmacol.* 95: 300-308, 1988.

- 11.- Bravo, H., Perrin, F., Sosa, R., Torres, R.: Incremento de la contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Ingeniería Ambiental* 1(40):8-14, 1988.
- 12.- Brunelleschi, S., Haye-Legrand, I., Lavat, C., Norel, X., Benveniste, J., Brink, C.: Platelet-activating-factor-acether-induced relaxation of guinea pig airway muscle: role of prostaglandin E<sub>2</sub> and the epithelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 356-363, 1987.
- 13.- Bureau, M.F., Arreto, C.D., Lefort, J., Vargaftif, B.B.: Albumin exchange and inflammatory cell recruitment in lungs of antigen-challenged guinea pigs: Role of histamine. *J. Appl. Physiol.* 77(1): 252-261, 1994.
- 14.- Campos IM, Church MK.: How useful are guinea-pig models of asthma?. *Clin. & Exp. Allergy.* 22: 665-666, 1992.
- 15.- Campos, M. G., Segura, P., Vargas, M. H. Vanda, C. B. Montañó, R. L.: O<sub>3</sub>-Induced Airway Hyperreactivity to Non-Cholinergic System and Other Stimuli. *J. Appl. Physiol.* 73 (1): 354-361, 1992.
- 16.- Clark, R.A., Gallin, J.I., Kaplan, A.P.: The Selective Eosinophil Chemotactic Activity of Histamine. *J. Exp. Med.* 142: 1462-1476, 1975.

- 17.- Coleridge, J.C.G., Coleridge, M.H., Schelegle, E.S. Green, J.F.: Acute inhalation of ozone stimulates bronchial C-fibers and rapidly adapting receptors in dogs. *J. Appl. Physiol.* 74(5): 2345-2352, 1993.
- 17b. Devlin BR., McKinnon KP., Noah T., Becker S, Koren HS.: Ozone-induced release of cytelines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 266 (*Lung Cell Mol. Physiol.* 10): L612-L619, 1994.
- 18.- Easton, R.E., Murphy, S.D.: Experimental ozone preexposure: effect on the acute toxicity and respiratory function effects of histamine in guinea pigs. *Arch. Environ. Health* 15: 160-166, 1967.
- 19.- Fabbri, L. M., Aizawa, H., Alpert, S. E., Walters, E. H., O'Byrne, P. M., Gold, B.D., Nadel, J. A. Holtzman, M. J.: Airway hyperresponsiveness and changes in cell counts in bronchoalveolar lavage after ozone exposure in dogs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 288-291, 1984.
- 20.- Folinsbee, L.J.: Human health effects of air pollution. *Environ. Health Persp.* 100: 45-56, 1992.

- 21.- Fourke JM, Wolin AD, McFadden ER.: Effects of ozone on lung mechanics and cyclooxygenase metabolites in dogs. *Prostaglandins* 42: 343-353, 1991.
- 22.- Gertner, A., Bromberger-Barnea, B., Dannenberg, A., Trystman, R., Mankes, H.: Responses of the lung periphery to 1 ppm ozone. *J. Appl. Physiol.* 55: 770-776, 1983.
- 23.- Golden, J. A., Nadel, J. A. Boushey, H. A.: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118: 287-294, 1978.
- 24.- Gordon, T., Admur, M.O.: Effect of ozone on respiratory response of guinea pigs to histamine. *J. Toxicol. Environ. Health.* 6: 185-195, (1980).
- 25.- Gordon, T., Drazen, J.M., Venugopalan, C.S., Admour, M.O.: Ozone-induced airway hyperreactivity in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 57: 1034-1038, 1984.
- 26.- Gordon, T., Tylor, B., Admour, M.O.: Ozone-inhibition of tissue cholinesterase in guinea pigs. *Arch. Environ. Health* 36: 284-288, 1981.

- 27.- Grundström, N., Andersson, R. G.: In vivo demonstration of alpha-2-adrenoceptor-mediated inhibition of the excitatory non-cholinergic neurotransmission in guinea pigs airways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328: 236-240, 1985.
- 28.- Hakerman, J.R., Plopper, C.G., Hyde, D.M., St.George, J.A., Wilson, D.W., Dungworth, D.L.: Response of Macaque Bronchiolar Epithelium to Ambient Concentrations of Ozone. *Am. J. Pathology.* 143(3):857-866, 1993.
- 29.- Hay, D. W. P., Farmer, S. G., Reaburn, D., Muccitelli, R. M., Wilson, K. A. Fedan, J. S.: Differential effects of epithelium removal on the responsiveness of guinea pig tracheal smooth muscle to bronchoconstrictors. *Br. J. Pharmacol.* 92: 381-388, 1987.
- 30.- Hazbun, M.E., Hamilton, Rr., Holian, A. Eschenbacher, W.L.: Ozone-induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F<sub>2a</sub> in the airways of human subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 568-572, 1993.
- 31.- Hazucha, M.J.: Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. *J.Appl. Physiol.* 62(4): 1671-1680, 1987.

- 32.-Holroyde, M.C., Norris, A.A.: The effect of ozone on reactivity of upper and lower airways in guinea pigs. *Br. J. Pharmacol.* 94: 938-946, 1988.
- 33.- Holtzman, M. J., Fabbri, L.M., O'Byrne, P.M., Gold, B., Aizawa, H., Walters, E., Alpert, S., Nadel, J.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127: 686-690, 1983.
- 34.- Holtzman, M.J., Cunningham, J.H., Sheller, J.R., Irsigler, G.B., Nadel, J.A., Boushey H.A.: Effect of ozone on bronchial reactivity in atopic and nonatopic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 120: 1059-1067, 1979.
- 35.- Hutchinson AA, Hinson JM, Bringham KL, Snapper JR.: Effect of endotoxine on airway responsiveness to aerosol histamine in sheep. *J. Appl. Physiol.* 54: 1463-1468, 1983.
- 36.- Irvin CG, Berend N. Henson PM.: Airway hyperreactivity and inflammation produced by aerosolization of human C5a-des-arg. *Am. Rev. Resp. Dis.* 134: 777-783, 1986.

- 37.- Janssen LM, O'Byrne PM, Daniel EE.: Mechanism underlying ozone-induced in vitro hyperresponsiveness in canine bronchi. *Am. J. Physiol.* 261 (Lung Cell. Mol. Physiol. 5): L55-L62, 1991.
- 38a.- Jones GL, Lane C, O'Byrne PM.: Effect of an inhaled thromboxane mimetic (U46619) on in vivo pulmonary resistance and airway hyperresponsiveness in dogs. *J. Physiol.* 453: 59-67, 1992.
- 38b.- Jones, G. L., Lane, C. G., Manning, P. J., O'Byrne, P. M.: Role of the parasympathetic nervous system in airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *J. Appl. Physiol.* 63: 1174-1179, 1987.
- 39.- Jones, K.P., Edwards, J.H., Reynolds, S.P., Petters, T.J., Davies, T.H.: A comparison of albumin and urea as reference markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 3: 152-156, 1990.
- 40.- Kallos P. Kallos L.: Experimental asthma in guinea pigs. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 73: 77, 1984.
- 41.- Karol MH.: Animal models of occupational asthma. *Eur. Respir. J.* 7: 555-568, 1994.

- 42.- Kreit, J.W., Gross, K.B., Moore, T.B., Lorenzen, T.J., D'arcy, J., Eschenbacher, W.L.: Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J. Appl. Physiol.* 66(1): 217-222, 1989.
- 43.- Lanes S, Stevenson JS, Codias E.: Immomethacin and FLP-57231 inhibit antigen-induced airway hyperresponsiveness in sheep. *J. Appl. Physiol.* 61: 864-872, 1986.
- 44.- Lee HK, Murlas C.: Ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs is abolished by BW 755C or FPL 55712 but not by indomethacin. *Am. Rev. Resp. Dis.* 132: 1005-1009, 1985.
- 45.- Lee L.Y., Dumont, C., Graf, P.D., Nadel, J.A.: Mechanism of rapid, shallow breathing after ozone exposure in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 46: 1108-1114, 1979.
- 46.- Lew, D.B., Chodimella, V., Murlas, G.C.: Guinea pig ozone-induced airway hyperreactivity is associated with increased N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in bronchoalveolar lavage fluid. *Lung* 168: 273-283, 1990.
- 47.- Li, Z., Daniel, E.E., Lane, C.G., Arnaout, M.A., O'Byrne.: Effect of anti-mol MAb on ozone-induced airway inflammation and airway hyperresponsivness in dogs. *Am. J. Physiol.* 263: L723-L726, 1992.



- 48.- Mc Donnell, W. F., Horstman, D. H., Abdul-Salaam, S., Raggio, L.J., Green, J.A.: The respiratory responses of subjects with allergic rhinitis to ozone exposure and their relationship to nonspecific airway reactivity. *Toxicol. Indust. Health*. 3: 507-517, 1987.
- 49.- Melhman, M.A. Borek C.: Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ. Res.* 41:36-53, 1987.
- 50.- Miller, P. D., Ainsworth, D., Lam, H. F., Amdur, M. O.: Effect of ozone exposure on lung functions and plasma prostaglandin and thromboxane concentrations in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88: 132-140, 1987.
- 51.- Montañó, L. M., Selman, M., Ponce-Monter, H. Vargas M. H.: Role of airway epithelium on the reactivity of smooth muscle from guinea pigs sensitized to ovalbumin by inhalatory method. *Res. Exp. Med.* 188: 167-173, 1988.
- 52.- Murlas C, Lee HK.: U-60, 257 inhibits O<sub>3</sub>-induced bronchial hyperreactivity in the guinea pig. *Prostaglandins* 30: 563-572, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 53.- Murlas, C. G. , Roum, J.H.: Sequence of pathologic changes in the airway mucosa of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 314-320, 1985.
- 54.- Murlas, C., Roum, J.H.: Bronchial hyperreactivity occurs in steroid-treated guinea pigs depleted of leukocytes by cyclophosphamide. *J. Appl. Physiol.* 58: 1630-1637, 1985b.
- 55.- Murlas, G.C., Lang, Z., Williams, J.G. Chodimella, V.: Aerosolized neutral endopeptidase reverses ozone-induced airway hyperreactivity to substance P. *J. Appl. Physiol.* 72(3): 1133-1141, 1992.
- 56.- Murlas, G.C., Murphy, P.T., Chodimella, V.: O<sub>3</sub>-induced mucosa-linked airway muscle hyperresponsiveness in the guinea pig. *J. Appl. Physiol.* 69(1): 7-13, 1990.
- 57.- Nishikawa, M., Ikeda, H., Nishiyama, H., Yamakawa, S., Suzuki, S., Okubo, T.: Combined Effects of ozone and cigarette smoke on Airway responsiveness and vascular permeability in guinea pigs. *Lung* 170: 311-322, 1992.

- 58.- O'Byrne P. M., Walters, E. H., Gold, B., Aizawa, H., Fabbri, L. M., Alpert, S. E., Nadel, J., Holtzman, M. J.: Neutrophil depletion inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130 : 214-219, 1984.
- 59.- Pryor, W.A.: Ozone in all its reactive splendor. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 483-486, 1994.
- 60.- Reportes de la Calidad del Aire en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México; SEDESOL 1993 y 1994.
- 61.- SEDUE (Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología) Informe sobre el estado del medio ambiente en México, 1985.
- 62.- Seligmann, B.E., Fletcher, M.P., Gallin, J.I.: Histamine modulation of human neutrophil oxidase metabolism, locomotion, degranulation and membrane potencial changes. *J. Immunol.* 130: 1902-1909, 1983.
- 63.- Shampain MP., Behrens BL, Larsen GL., Henson PM.: An animal model of late pulmonary responses to *Alternaria* challenge. *Am. Rev. Resp. Dis.* 126: 493-498, 1982.

- 64.- Sheppard D.: Mechanisms of acute increases in airway responsiveness caused by environmental chemicals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81.: 128-132, 1988.
- 65.- Shields, R. L. Gold, W. M.: Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious guinea pigs. *Environ. Res.* 42: 435-445, 1987.
- 66.- Shore, S.A., Stimler-Gerard, N.P., Coats, S.R. Drazen, J.M.: Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 331-336, 1988.
- 67.- Teeper, J.S., Costa, L.D., Fitzgerald, S., Doerfler, L.D., Bromberg, A.P.: Role of tachykinins in ozone-induced acute lung injury in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 75(3): 1404-1411, 1993.
- 68.- Teeper, J.S., Wiester, M.J., Weber, M.F. Menache, M.G.: Time course of inflammation in the rat exposed to ozone for short and prolonged periods with intermittent hyperventilation. *Fundam. Appl. Toxicol. En prensa.*

- 69.- U.S. Environmental Protection Agency, Review of the national ambient air quality standards for ozone: assessment of scientific and technical information. (1989) OAQPS staff paper. Research Triangle Park, NC: Office of Air Quality Planning and Standards; EPA report no. EPA-450/2-92/001. Available from NTIS, Springfield, VA; PB92-190446.
- 70.- Vargas MH., Montaña RL., Paramo I, Selman LM.: An inhalatory method using ovoalbumin and *Bordetella pertussis* for inducing allergic bronchoconstriction in guinea pigs. *Med. Sci. Res.* 15: 179-180, 1987
- 71.- Ward, C., Duddridge, M., Fenwick, J., Gardnier, P.V., Fleetwood, A., Hendrick, DJ., Walters, E.H.: Evaluation of albumin as a reference marker of dilution in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic and control subjects. *Thorax* 48: 518-522, 1993.
- 72.- Wiester, M.J., Tepper, J.S., Weber, M.F. Menache, M.G.: Histamine and metacholine aerosol bronchial challenge in awake guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 27-33, 1990.

- 73.- Yeadon, M., Wilkison, D., Darley-USmar, V., O'learly, V.J., Payne, A.N.: Mechanisms contributing to ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Pulm. Pharmacol.* 5: 39-50, 1992.
- 74.- Ying, R.L., Gross, T.S., Terzo, W.L., Eschenbacher.: Indomethacin does not inhibit the ozone-induced increases in bronchial responsiveness in human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 817-821, 1990.