

00381

2
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL OZONO EN LA REACTIVIDAD DEL SISTEMA
CONTRACTIL NO-COLINERGICO Y EN EL RETO
ANTIGENICO DE LAS VIAS AEREAS DE COSAYOS
ASMATICOS Y SU RELACION CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA)

PRESENTA

M. EN C. MARIA GUADALUPE CAMPOS LARA

MEXICO D.F.

1990

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
Mecanismos moleculares de la toxicidad del ozono	2
Efectos colaterales del ozono	5
Biológicos	5
Morfológicos	8
Mecánica respiratoria	10
Adaptación e tolerancia	11
Hiperreactividad bronquial	13
Daño epitelial	16
Inflamación de las vías aéreas	18
Mecanismos neurales	22
Sistema nervioso noradrenérgico norcolinérgico excitatorio, taquicinas y control de las vías aéreas	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPOTESIS	27
MÉTODOS	30
Animales	30
Exposición a ozono	30
Procedimiento de sensibilización	30
Estudios in vivo	31
Estimulación vagal norcolinérgica	32
Reactividad a histamina.....	32
Reto antigénico.....	32
Estudios in vitro	33
Lavados broncoalveolares	34
Análisis de datos	34
RESULTADOS	35
Estimulación norcolinérgica	36
Reactividad a histamina in vivo	38
Sensibilidad a histamina in vitro	40
Reto antigénico	41
Lavados broncoalveolares	41
DISCUSIÓN	42
REFERENCIAS	43

Resumen de la tesis que para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Biología) presenta la M. en C. María Guadalupe Campos Lara

EFFECTO DEL OZONO EN LA REACTIVIDAD DEL SISTEMA CONTRACTIL NO-COLINERGICO Y EN EL RETO ANTIGENICO DE LAS VIAS AEREAS DE COBAYOS ASMATICOS Y SU RELACION CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA

El ozono, un contaminante atmosférico común en áreas urbanas, es extremadamente tóxico y puede causar daño oxidativo de las membranas celulares de las vías aéreas e inducir hiperreactividad bronquial. Se ha propuesto que el reflejo vagal, el daño epitelial y la liberación de mediadores inflamatorios de las células cebadas, los neutrófilos y los eosinófilos son mecanismos involucrados en dicha hiperreactividad. Hasta la fecha no se ha estudiado si el ozono induce hiperreactividad a las taquicininas endógenas liberadas del sistema contractil no colinérgico. Los objetivos de este estudio fueron estudiar en cobayos no sensibilizados y sensibilizados con ovoalbúmina (asmáticos) si el ozono (3 ppm durante una hora y estudiados 16 horas después de la exposición) induce hiperreactividad bronquial in vivo a la estimulación del sistema contractil no-colinérgico, a la respuesta a histamina y al reto antigénico, y si altera la población celular de los lavados broncoalveolares. Asimismo se estudió la participación del epitelio en la hiperreactividad a histamina inducida por ozono en tráqueas aisladas en ambos grupos de cobayos. Los resultados mostraron que la exposición a ozono: A. Indujo hiperreactividad de las vías aéreas 1) al estimular el sistema contractil no-colinérgico (estimulación eléctrica de los nervios vagos cervicales previa administración de atropina) en cobayos no sensibilizados; 2) a la histamina en cobayos sensibilizados y no-sensibilizados in vivo; 3) al reto antigénico en cobayos sensibilizados. B. Produjo hiperreactividad bronquial al estimular el sistema contractil no-colinérgico en cobayos sensibilizados. C. En los lavados broncoalveolares aumentó el número de neutrófilos en cobayos no-sensibilizados y sensibilizados. D. No indujo hiperreactividad a histamina en las tráqueas in vitro con y sin epitelio. El proceso de inmunización produjo hiperreactividad a la estimulación no-colinérgica en cobayos sensibilizados así como aumento del número de eosinófilos en los lavados broncoalveolares. En conclusión, la exposición única a 3 ppm de ozono durante una hora produjo una respuesta inflamatoria aguda que desempeña un papel importante en la hiperreactividad a la estimulación no-colinérgica y a la histamina, así como en el aumento de la sensibilidad al reto antigénico de animales sensibilizados. El epitelio de las vías aéreas no desempeña un papel preponderante en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono.


Vo.Bo. Asesor de tesis

Resumen de la tesis que para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Biología) presenta la M. en C. María Guadalupe Campos Lara

EFFECT OF OZONE ON THE REACTIVITY OF THE NON-CHOLINERGIC CONTRACTILE SYSTEM AND ON THE ANTIGENIC CHALLENGE OF ASTHMATIC GUINEA PIGS AIRWAYS AND ITS RELATIONSHIP TO THE INFLAMMATORY RESPONSE

Ozone exposure produces airway hyperreactivity in humans and several mammals, and it has been postulated that epithelium damage, vagal reflexes and chemical mediators release from inflammatory cells are mechanisms involved. The aims of this study were investigate in non-sensitized and sensitized with ovalbumin (asthmatics) guinea pigs wether ozone induces hyperreactivity to endogens tachicininins released from the non-cholinergic contractile system, to histamine and to antigenic challenge, and wether ozone alters the cell number of bronchoalveolar lavage. Likewise the role of epithelium on the hyperreactivity to histamine induced by ozone on isolated tracheas from both animals groups has been studied. The results showed that ozone exposure (3 ppm, 1 h, 16 h before studies): A. Induced airway hyperreactivity 1) to stimulate the non-cholinergic contractile system (electrical stimulation of both cervical vagus nerves in the presence of atropine) en non-sensitized guinea pigs; 2) to histamine in non-sensitized and sensitized guinea pigs in vivo; 3) to antigenic challenge in sensitized guinea pigs. B. Induced hyporreactivity to non-cholinergic system stimulation in sensitized guinea pigs. C. In bronchoalveolar lavage ozone increased the neutrophils number in non-sensitized and sensitized guinea pigs. D. Induced hyperreactivity to histamine on in vitro tracheas with and without epithelium. Sensitization procedure produced hyperreactivity to non-cholinergic stimulation and increase in the eosinophils number recovered by bronchoalveolar lavage. We conclude that the single exposure to 3 ppm ozone during one hour produced an inflammatory response which plays an important role in the bronchial hyperreactivity to non-cholinergic stimulation and to histamine, as well as in the increase in sensitivity to antigenic challenge in sensitized animals. Airway epithelium seems to play a minor role in this hyperreactivity.



INTRODUCCION

El ozono, una especie reactiva de oxígeno, es un importante constituyente natural de la atmósfera (Gallo y Allen, 1970). Los niveles normales de ozono en la atmósfera baja se encuentran alrededor de 1.0 ppm y varían al ascender con la elevación geográfica, la radiación solar y las condiciones climáticas. Ya que algunos efectos del ozono son asimétricos (Ehrlichman et al., 1974), sus acciones pueden presentarse en presencia de radiación ionizante natural y/o de fuentes antropogénicas (Ehrlichman y Bardi, 1987).

Aunque el ozono atmosférico protege a la flora del proceso de radiación solar ultravioleta, es reconocido como el contaminante atmosférico urbano más nocivo, ya que los niveles altos de ozono en el ambiente son tóxicos y representan un riesgo para la salud del hombre. Como consecuencia, los efectos biológicos del ozono han sido estudiados extensamente en plantas, animales y humanos (Organización Mundial de la Salud, 1978) y sus niveles ambientales están sujetos a regulaciones gubernamentales en Estados Unidos de América. Actualmente se ha establecido que la concentración máxima de ozono tolerable es como la que puede estar sujeto el hombre es 0.10 ppm (0.10 mg/l) por hora. Este nivel de ozono es un promedio por hora que se debe cumplir durante una vez por año (según el Acta de Protección Ambiental, 1978).

Es generalmente reconocido que los efectos tóxicos del ozono se deben a su gran capacidad oxidativa. Como un poderoso oxidante, el ozono puede reaccionar con virtualmente toda clase de moléculas biológicas. Debido al gran número de sitios biológicos susceptibles y a la variedad de efectos que puede resultar de la interacción entre el ozono y los componentes biológicos, la toxicidad del ozono es compleja, por lo que identifica la lesión toxicológica crucial o crítica es casi imposible (Hassall, 1979).

Los efectos clínicos del ozono se manifiestan, por su toxicidad y corrosión en los pulmones. Por lo tanto el efecto respiratorio es el efecto principal de la toxicidad del ozono. Los estudios también se han concentrado en los efectos sobre: células (Belland, 1979; Mohlan y Birch, 1987).

Como resultado de un gran número de investigaciones en diferentes especies se ha concluido que la toxicidad del ozono experimenta con el ozono se incrementa con la concentración (Agencia Americana de Protección Ambiental, 1978). La atención del daño pulmonar y fisiológico inducido por ozono aumenta considerablemente de la toxicidad de las células biológicas experimentales en los cultivos y tejidos, y es regulada por la cantidad de toxicidad de su reacción con el gas (Agencia Americana de Protección Ambiental, 1978).

Los niveles a los cuales la toxicidad del ozono es evidente dependen de una variedad de parámetros. Estos incluyen factores genéticos, especie, anatomía de las vías aéreas, estado de desarrollo así como factores del hospedero como enfermedad preexistente, edad, estado hormonal y nutricional y sistemas de defensa preexistentes. Una última, que directa o indirectamente vincula el daño fisiológico inducido por ozono, sirve como un factor crítico al establecer los efectos del ozono sobre la salud (Goldstein, 1979; Organización Mundial de la Salud, 1979).

MECANISMOS MOLECULARES DE LA TOXICIDAD DEL OZONO

Aunque la toxicología y física del ozono se desconocen, se han propuesto varias teorías sobre su toxicidad. Los mecanismos fisiológicos considerados que las reacciones celulares son los sitios principales de toxicidad, sugieren que el daño que causa el ozono es inducido parcialmente por radicales libres. Tales reacciones son las siguientes:

1. El ozono, antes de iniciar la oxidación de los tejidos, genera radicales libres de las membranas celulares. Los peróxidos y los radicales secundarios reactivos de especies consecuentes producen su toxicidad al dañar la in-

regrados de la membrana celular y de otras moléculas color
luzes (Czaja y Tansel, 1972, 1973).

2. El ozono ataca su toxicidad al oxidar péptidos o
proteínas de tipo glicosolubol que contienen grupos
funcionales como tioles, aminas, hidratos y alcoholes.
Tantó los péptidos solubles como las proteínas membranales
son blanco potencial de la acción del ozono (Herman y Mand,
1981; Mand et al., 1982).

Ya que las membranas están constituidas tanto de pro-
teínas como de lípidos, es difícil separar ambos mecanismos
y se considera que ambas acciones son complementarias y que
la oxidación de lípidos como insaturados y proteínas ocurre
simultáneamente. La peroxidación de los ácidos grasos
insaturados da lugar a productos solubles en agua como
aldehídos, peróxidos y radicales hidroxilo (Fryer, 1979) que
difunden al citosol e inician la oxidación proteica (Mandel,
1984).

Las velocidades relativas de reacción del ozono con
diversas sustancias biológicas son bastante diferentes. El
ozono oxida grupos sulfuro al menos mil veces más rápidamente que a
otros compuestos. En consecuencia, se ha visto mayor
resistencia a las células grasas insaturadas como blanco del
ozono: en presencia de sulfuros proteínicos como el agua,
los radicales sulfuro pueden resultar directamente de su
decomposición por la oxidación inicial a ozono.
Independientemente del mecanismo anterior, una vez que los
radicales libres son generados en las membranas, los efectos
tóxicos son similares: estos consisten en pérdida de la
regulación de electrolitos y agua, lesiones en la permea-
bilidad, fuga de enzimas involucradas esenciales e in-
hibición de cadenas respiratorias de las mitocondrias
o de las mitocondrias. Si el daño es suficientemente
grave, la célula puede recuperarse y morir. En los tejidos
de animales expuestos a ozono ocurre una necrosis necrótica
(Mandel, 1984).

El grado en el que el sistema reacciona con los productos está determinado por la dependencia de los ácidos grasos saturados en sus sitios activos (Freeman y Mead, 1961; Demmel, 1971) y la localización de los receptores en la estructura terciaria de las proteínas. Por ejemplo, sistema, nacional, triplicado son muy susceptibles al ácido (Mead et al., 1969). La oxidación del triptófano produce derivados tóxicos que afectan otros sistemas reactivos y vitales del sistema (Mead y Friedberg, 1970).

La relación entre la peroxidación de los ácidos grasos insaturados y la oxidación de las proteínas se complica por el hecho de que el metabolismo de las estructuras terciarias de las proteínas membranales depende de los lípidos asociados. Cualquier alteración en los lípidos que rodean a las proteínas membranales resulta en alteraciones estructurales y cambios en la función normal (Schlimm y Borah, 1967). Estas proteínas incluyen catalisadores de procesos que previenen a la célula factores reducidos como la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato (Belucia et al., 1972).

La hipotesis de que la peroxidación de los lípidos es el factor primario en la toxicidad del ozono in vivo está apoyada sólidamente en los hallazgos de que la vitamina E, un antioxidante deficiente nutricional, es una poderosa agente protector de la toxicidad del ozono (Chen, 1968; Chev et al., 1961; Mustafa, et al., 1963; Flinois et al., 1970). La vitamina E inhibe fácilmente la peroxidación de los ácidos grasos insaturados iniciada in vitro por el ozono (Rocha et al., 1971). Los animales deficientes en vitamina E y expuestos a 0.7 ppm de ozono 8 horas diarios durante 5 días mostraron una reducción de la peroxidación de liposomas en comparación con animales alimentados con 2500 mg de vitamina E/kg que redujeron la oxidación de la leucotina y por lo tanto protegieron completamente (Chen, 1968). La efectividad antioxidante de la vitamina E es aumentada por otros antioxidantes como el ácido ascórbico que funciona

debe suministrarse en la fase avanzada de la vida con la vitamina E que funciona como antioxidante en la fase lipídica (Wietner y Tappel, 1973). El contenido de proteínas de las levaduras seleccionadas de cepas deficientes en vitamina E fue mucho mayor que el de animales que recibieron una dieta adecuada de vitamina E y proporcional a la concentración de agua a la cual se expusieron los rebayos y que fue de 0.1 a 0.75 ppm durante 3 horas (Hu et al., 1972).

EFFECTOS PULMONARES DEL OXIGENO

E i c a l i c a s

Los cambios bioquímicos en el sistema respiratorio consecuentes a la exposición a oxígeno son complejos y dependen de la edad (Hilkey et al., 1962; Mustafa et al., 1970). Muchos cambios bioquímicos detectados involucran alteraciones en el metabolismo intermediario (Mustafa y Low, 1976) y en sistemas enzimáticos que funcionan como vías de detoxificación del oxígeno (Mehanna y Turki, 1967; Mustafa et al., 1968).

La inducción del sistema de la peroxidasa de glutatión, constituido de la peroxidasa de glutatión-s-transferasa y las reductasa y peroxidasa de glutatión, es uno de los índices bioquímicos más sensibles ante la exposición al oxígeno. Se han reportado cambios en el nivel de estas enzimas expuestas a 0.1 ppm de oxígeno durante 7 días (Shou et al., 1971). La inducción del sistema de la peroxidasa de glutatión también se ha reportado en ratones expuestos a 1.2 ppm, 6 horas diarias durante 7 días (Mustafa y Low, 1976). Estas evidencias apoyan la idea de que al menos aumenta la capacidad de los acidos grasos insaturados, la cual es un buen índice al sistema de la peroxidasa de glutatión como un mecanismo protector. Los cambios bioquímicos pueden variar cualitativamente por la especie o con el régimen de exposición. Shou et al. (1971) y Mustafa et al. (1976) señalan que los efectos en ratones expuestos indican que la capacidad reactiva de

altamente a control estricto de 0.2 a 0.5 ppm de oxígeno durante 7 días sucesivos. Los reportes de otros investigadores, especialmente que mencionan oxígeno a 0.5 ppm durante 2 horas fueron poco efectivos. Estos países entonces mencionan que en varios experimentos al reducirse el oxígeno, la eructación de acetaminato. La utilización de glucosa, la formación de ATP, la oxidación de succinato, la producción de glutatión, la producción de dimetileno, el contenido de sulfhidrilo no proteínico, la permeabilidad de plasmático y la disminución de sus niveles se incrementaron, algunos hasta 50% para la mayoría entre 10 y 100 de los valores control en el animal por la exposición a oxígeno. Los experimentos fueron excepcionales a la concentración de oxígeno inhalado, pero no a la duración del tratamiento, así como que se alinea al periodo crítico de exposición que no se le hacen divisiones durante 4 días (Montana y Leo, 1971).

Se ha reportado la difusión de proteínas plasmáticas en las vías aéreas consecuentemente a la exposición a oxígeno en perros (Reaser et al., 1970), ratas (Gilbert et al., 1971) y cobayos (Hu et al., 1981). Las células leucocitarias se incrementaron en el pulmón (Cassidy et al., 1973; Dillard et al., 1972) y probablemente representan parte del proceso inflamatorio que se observa por la exposición a oxígeno.

En contraste con la reducción de proteínas plasmáticas, debido a la exposición a oxígeno, también se ha reportado que un gran número de eritrocitos son inhibidos inmediatamente después de la exposición a oxígeno y así como de otros a horas más, y cuando se recuperan a sus valores normales e incluso los citos en 3 o más días dependiendo de la dosis y el oxígeno (De Luca et al., 1972; Williams et al., 1979; Harshbarger et al., 1978). Los animales que sobrevivieron más con su control respiratorio tras la exposición a oxígeno (Montana et al., 1972). También se ha reportado la oxidación de glutatión y la formación de disulfuros en los pulmones de ratas expuestas a oxígeno (De Luca et al., 1972).

El efecto de la exposición a un agente mutageno en el sistema de activacion de anticuerpos depende de la naturaleza de la especie de anticuerpo, el sitio y el tipo de anticuerpo (Hollmann et al., 1971). Estudios de prueba de que el induccion de la respuesta anticuerpo puede ser afectada por la dosis y el tiempo. En los estudios a largo plazo del efecto de los individuos que exponen repetidamente de los anticuerpos, se ha observado que incluso los individuos con una alta dosis de anticuerpos pueden sufrir deficiencia (Carpell et al., 1971).

El sistema del sistema T-BC, importante en el metabolismo del cancer, se inhibe en hepatitis (Fajers et al., 1971) y cirrosis (Goldstein et al., 1970) como consecuencia de una fuerte exposicion a toxinas a niveles de 0.75 a 1 ppm. La inhibicion de este sistema inmunologico incrementa el dano inducido por cancer debido a que disminuye la destrucccion de plaquetas leucocitos incluyendo neutrofilos y carcinomas. Tambien se ha reportado la inhibicion de la sintesis de glicoproteinas, una clase unida a la membrana (Menzel et al., 1971). La inhibicion puede deberse a la disminucion de los lipidos membranales o a la disminucion de aminoacidos del sitio activo de la enzima. Gordon et al. (1961) estudiaron la inhibicion de la acetilcolinesterasa de pulmon, cerebro y diafragma de ratas en un intento de explicar la hiperactividad bronquial observada en cobayos y humanos expuestos a aerosol. La actividad de la acetilcolinesterasa disminuye al disminuir de 100 ppm cuando la exposicion fue a 0.1 ppm y a 10% en exposiciones a 0.2 ppm. Esta disminucion podria originar una hiperactividad elevada de acetilcolina en la membrana linfocitaria y de este modo dar lugar al aumento de actividad linfocitaria conduciendo a la exposicion de cancer. La falta de una clara relacion causal tradicionalmente se ha atribuido a este aumento.

1959; Moore y Schmitt, 1961).

En las aves se han observado los molinos alados asociados con las aves domesticas, tales como palomas y carpas, tales como D. 10.5 con 40.5 e 21 horas durante 7 días en ratas (Schmitt et al., 1970), cerdos (Castellana et al., 1977; Bannister et al., 1975; Mellick et al., 1977) y ratones (Ibrahim et al., 1966).

Los molinos epiteliales-alveolares del tipo II son más resistentes al oxígeno y se han observado en células epiteliales que se diferencian en el tipo I durante el proceso de reparación de las lesiones inducidas por oxígeno (Evans et al., 1970). Durante y después de exposiciones sucesivas a oxígeno, las células tipo II continúan proliferar; esta proliferación es característica del tejido por oxígeno independientemente de la especie. En ratas, la cantidad de DNA en las células tipo II se ha observado con oxígeno como el tipo I después de la exposición a O₂ por 48 horas (Evans et al., 1974) y después de tres veces a 2 las días de exposición continua a O₂ o O₂ por 24 horas (Evans et al., 1974) o tipo O₂ por 48 horas (Evans et al., 1970). Cuando las células tipo II proliferan en los pulmones expuestos a oxígeno, la completa maduración y diferenciación a tipo I no ocurre, aun después de exposiciones de 180 días (Evans y Schmitt, 1961). La exposición continua a oxígeno inhibe tanto la maduración celular como la cantidad de las células tipo II.

Se han realizado estudios que demuestran los molinos alveolares con las alteraciones morfológicas en ratas con dieta normal o deficiente en vitamina E (Clay et al., 1961; Fisher et al., 1969; Salt et al., 1960; Schmitt et al., 1970). Las lesiones pulmonares en ratas con dieta deficiente en vitamina E fueron severas que las de ratas normales al ser fedas con dietas normales que son deficientes en vitamina E (Borenstein et al., 1977) y los cambios morfológicos en el tipo II de las células de la vitamina E. Sin embargo, los cambios morfológicos inducidos por

0.5 ppm) tiene consecuencias importantes ya que produce aumento de la susceptibilidad pulmonar y deterioro de la estabilidad de las vías aéreas y distensión pulmonar, lo que sugiere un mecanismo de fibrosis pulmonar (Wagner et al., 1982). Recientemente se ha observado en monjes que el asma aguda y subaguda de las vías aéreas ocurrido como incremento en la susceptibilidad pulmonar e inducido por asma ocurre rápidamente y es susceptible a muy corto plazo (30 min) a 0.5 ppm de ozono (Fuchs et al., 1983).

Adaptación a la tolerancia

Numerosos estudios han indicado que la exposición a bajas concentraciones de ozono hasta los niveles considerados tolerantes al producir de una segunda exposición a ozono. La tolerancia se produce en todas las formas de daño pulmonar. La exposición de ratas a 0.5 ppm de ozono previene el edema pulmonar pero tiene poco efecto en la reducción de la actividad amilásica, la inflamación y el aumento en el número de macrófagos (Hilbert y Lewis, 1971; Gardner et al., 1972). La adaptación a exposiciones prolongadas de ozono se observa en el epitelio bronquial de las ratas (Mikula et al., 1982), ya que se ha reportado disminución del daño celular en comparación con exposiciones agudas, aunque la exposición tiene una limitación en la recuperación celular tras una segunda exposición (Fuchs et al., 1978).

En humanos, la adaptación a la exposición a ozono se ha estudiado ampliamente, porque la exposición a 0.5 ppm de ozono produce efectos en la función respiratoria, diversos estudios apoyan la respuesta adaptativa en humanos normales, la cual se presenta al inicio del quinto día de exposición (Fennell et al., 1970; Miller et al., 1970). También se ha señalado que las personas muy susceptibles al ozono experimentan la adaptación a largo plazo al estar a la exposición a ozono que ocurre entre los 7 y 30 días (Hornbush et al., 1981). Se ha señalado que en humanos también se presenta adaptación de la susceptibilidad bronquial a irritación tras

repatidas de población a edad adulta (Dille et al., 1983). Sin embargo, también se ha observado que cuando se encuentran 3 veces a concentraciones más altas de ozono (O₃) pero no presentan adaptación a la contaminación de la familia viviendo en una exposición atmosférica a concentraciones más altas de ozono (1.02 a 0.5 ppm) (Dille et al., 1983). Tanto los síntomas de la irritación de las vías aéreas como los cambios en la función pulmonar que son producidos por una exposición única a ozono disminuyen tras repetidas exposiciones a ozono durante 3 a 5 días consecutivos (Dille et al., 1981; Farrell et al., 1979; Follis et al., 1980; Hagway et al., 1977). La similitud de la concentración de ozono y el tiempo necesario para el desarrollo de la tolerancia en los estudios que analizan cambios en síntomas, volumen pulmonar, calibres de las vías aéreas y capacidad broncopulmonar sugiere que todos los cambios pueden depender de un mecanismo común.

La adaptación puede ser una de las razones por las que algunos investigadores no han encontrado cambios significativos en la capacidad pulmonar tras exposiciones agudas a ozono. En concordancia con los residentes de ciudades relativamente limpias en Canadá, los residentes del sur de California donde prevalecen altas concentraciones de ozono presentaron respuestas bajas al ozono (Hagway et al., 1977).

Aunque el fenómeno de la adaptación no es un fenómeno sorprendente, se han observado varios estudios (Hagway y Finney, 1972). El mecanismo principal de defensa por hormonal o neuroendocrino (Libert y Lewis, 1971; Gardner et al., 1972). Hay evidencia de que el ozono causa la toxicidad celular y en algunos casos aumenta el espesor del moco, factores que además contribuyen a la irritación del bronquio. Recientemente se ha reportado que la adaptación de la función pulmonar a la contaminación atmosférica puede estar relacionada con los cambios fisiológicos y morfológicos del tejido pulmonar durante la exposición (Dille et al., 1989). La misma observación se ha realizado en humanos, en los que

la hiperreactividad de las vías aéreas bronquiales, aunque la función pulmonar muestra anomalías (Fletcher et al., 1970).

Hiperreactividad bronquial
Estímulos físicos (aire frío, esencial), agentes farmacológicos (antagonistas adrenérgicos inhalados, salbutamol), medicamentos de la anafilaxia (histamina, penicilina G), gases tóxicos (ozono, anhídrido de nitrógeno, anhídrido de sulfuro) y partículas (sulfatos, nitratos) producen broncoconstricción en algunos individuos. La toxicidad de la respuesta (es decir, el grado de broncoconstricción) a estos diferentes estímulos indica la sensibilidad de las vías aéreas de un sujeto particular. Esta sensibilidad e irritabilidad es un índice de reactividad de las vías aéreas. La hiperreactividad de las vías aéreas es una reducción en la tolerancia, o un incremento en el grado de broncoconstricción, a alguno de esos estímulos, y parece ser un sensible indicador de la existencia de anomalías en las aéreas. Por ejemplo, pacientes con vías aéreas alérgicas (Fish et al., 1976) o con bronquitis crónica (Leitch, 1974) e individuos en recuperación de infecciones víricas agudas (Hobby et al., 1974) han mostrado una hiperreactividad bronquial. Debido a que la hiperreactividad bronquial es una sensibilidad por encima de la normal en las vías aéreas a algunos estímulos causados por alguna condición patológica o alérgica, se han diseñado pruebas estandarizadas de broncoconstricción que se utilizan para investigar el nivel, sensibilidad y patógenia de una variedad de condiciones ambientales de las vías aéreas.

Se ha demostrado que la inhalación de aerosol durante un ejercicio físico incrementa sustancialmente los síntomas equivalentes la reactividad in vivo del sistema límbico de las vías aéreas en fumadores y en varios asmáticos. El ejercicio físico ambiental que evidentemente está asociado con la reactividad de las vías aéreas es el asma.

Desde la década de los años 30 hasta el presente (1967) cuando se dio el primer paso en la comprensión de la fisiología de la histamina, se ha observado que el cuerpo humano es susceptible a numerosos estímulos broncoconstrictores en varias especies de mamíferos incluyendo al hombre. En el cuadro III. 1 se enlistan los cambios que desde 1937 a la fecha han sufrido que el cuerpo humano hiperreactividad de las vías aéreas, y se hace referencia a la respuesta, la concentración de asma y el tiempo de exposición utilizados.

Sobre la base de los estudios de los cambios de los cambios ambientales en la reactividad del músculo liso de las vías aéreas in vivo a los estímulos broncoconstrictores se considera que son varios los mecanismos responsables de la hiperreactividad bronquial y entre ellos se consideran los siguientes: a) el efecto del epitelio de las vías aéreas con el consecuente aumento de la permeabilidad de la mucosa a agentes broncoconstrictores aumentando la penetración de los estímulos al músculo liso. b) Disminución del calibre de las vías aéreas, el aumento de la vascularidad de los receptores de irritación de las vías aéreas a estímulos inespecíficos que se vincula con el aumento de la vascularidad de la vía del reflejo vagal. c) Desajuste del control sobre normal de las vías aéreas de "hidro" y "electrolitos" de la parte bronquial. d) Aumento de la vascularidad, edematosa y hiperpermeabilidad de las vías aéreas. e) Aumento de la vascularidad del músculo liso de las vías aéreas a mediadores químicos. f) Aumento de los receptores farmacológicos del músculo liso de las vías aéreas. g) La respuesta inflamatoria con la consiguiente liberación de mediadores químicos como histamina, factores quimiotácticos de células inflamatorias y estabilización del ácido araquidónico. Todos estos mecanismos de una naturaleza tan compleja contribuyen en sí misma a la aparición de asma. En relación a las respuestas a diferentes estímulos de la hiperreactividad de asma, existe duda por el hecho de que...

CUADRO 1.
ESTUDIOS DE HIPERREACTIVIDAD PROVINCIAL INDUCIDA POR OIGONO

<u>Autor(es)</u>	<u>Año</u>	<u>Reactiva</u>	<u>Tem. de O₂</u>	<u>Tiempo de exposición</u>
Lee et al.	1977	perro	0.7-1.2	2 hr
Golden et al.	1978	alacano	0.8	2 hr
Holtzman et al.	1979	humano	0.8	2 hr
Lee et al.	1979	perro	1.2	2 hr
Abraham et al.	1980	ovada	0.8	2 hr
Gordon y Lazar	1980	cobayo	0.8	1 hr
Dimes et al.	1981	humano	0.3-0.4	2 hr
Holtzman et al.	1983	perro	1.0-2.2	2 hr
Holtzman et al.	1983	perro	2.1	2 hr
Gordon et al.	1984	cobayo	1.0-1.2	1 hr
O'Byrne et al.	1984	perro	3.0	2 hr
O'Byrne et al.	1984	perro	3.0	2 hr
Reus y Murias	1984	cobayo	3.0	2 hr
Aizawa et al.	1985	perro	3.0	2 hr
Lee y Murias	1985	cobayo	3.0	15 min
Murias y Lee	1985	cobayo	3.0	15 min
Murias y Reus	1985	cobayo	3.0	2 hr
Murias et al.	1985	cobayo	3.0	2 hr
Saitou et al.	1986	humano	0.6-0.6	2 hr
Jones et al.	1987	perro	3.0	30 min
McDonnell et al.	1987	humano	0.15	2 hr
Fouca et al.	1988	macaco	0.8	5 min
Holroyde y Morris	1988	cobayo	3.5	30 min
Jones et al.	1988	perro	3.0	30 min
Fleebarger et al.	1988	perro	1.0	5 min
Kreit et al.	1989	humano	0.4	2 hr
Murias et al.	1990	cobayo	3.0	2 hr
Nambu et al.	1990	perro	3.0	2 hr

A continuación se reseñan los mecanismos que se han involucrado en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono.

Daño epitelial

La exposición a ozono induce cambios morfológicos en el epitelio respiratorio que pueden ser parcialmente responsables tanto del incremento en la broncoconstricción refleja, al sensibilizar y/o exponer los nervios subyacentes a los estímulos mecánicos y químicos, como de la hiperreactividad traqueal al incrementar la permeabilidad permitiendo que mayor número de mediadores broncoconstrictores estimulen el músculo liso.

El daño al epitelio respiratorio se ha observado en varias especies expuestas a dosis de 0.2 ppm de ozono y más altas. Los sitios de daño incluyen la tráquea (Schwartz et al., 1976; Cavender et al., 1977), los bronquios (Castleman et al., 1977), los bronquiolos (Castleman et al., 1980), los conductos alveolares y los alveolos (Stephens et al., 1974; Schwartz et al., 1978). Se ha reportado prominente descamación de células cilíadas y caliciformes del epitelio de las vías respiratorias en gatos (Tostman et al., 1974).

Algunos estudios de la reactividad de las vías aéreas inducida por la exposición a ozono indican un estado hiperreactivo resultante de una disrupción del epitelio respiratorio y una sensibilización de los nervios subyacentes a los estímulos mecánicos y químicos (Nadel, 1984; Lee et al., 1979).

Asimismo se ha observado que el flujo de varios solutos polares a través del epitelio respiratorio de cobayos aumenta después de la exposición a 1 ppm (Davis et al., 1980). Moléculas tan grandes como la ovalbumina pueden alcanzar sus receptores inmunológicos en los pulmones de ratones expuestos a 0.5 o 0.8 ppm de ozono continuamente durante 3 a 5 días (Ombelet et al., 1980). La exposición a ozono aumenta la permeabilidad del epitelio respiratorio en cobayos y ratas

(Hu et al., 1982; Costa et al., 1985). Tras 3 horas de exposición a ozono a una concentración tan baja como 0.26 ppm, se ha observado un aumento en la concentración proteica del lavado broncoalveolar de cobayos, lo cual es indicativo de aumento de la permeabilidad del epitelio respiratorio en cobayos (Hu et al., 1982). Se ha estudiado la naturaleza y progresión del daño de la mucosa de las vías aéreas y la actividad bronquial sustancia en cobayos expuestos a 3 ppm de ozono durante 2 horas. La disminución del número de células caliciformes indicó que la hiperreactividad bronquial inducida por ozono se relaciona con el daño de la mucosa de las vías respiratorias y la infiltración de células cebadas (Morris y Room, 1985).

Exposiciones muy breves a ozono (0.5 ppm, 5 min) también han causado daño epitelial en mandriles. Ya que el cromoglicato sodico, un estabilizador de la membrana celular, particularmente de células cebadas, disminuyó el efecto inducido por ozono, se hipotetiza que este daño las células epiteliales superficiales con una consecuente liberación de agentes broncoconstrictores (Fould et al., 1985).

En humanos también se ha estudiado si la exposición a ozono altera la permeabilidad del epitelio respiratorio midiendo la tasa de eliminación pulmonar del ácido dietileno triamino pentacético radiactivo. Los resultados correlacionan positivamente la disminución de la función pulmonar con el aumento de la permeabilidad epitelial inducida por ozono (0.4 ppm; 0.25 h) (Mahl et al., 1977).

Por otro lado, se ha reportado que el epitelio de las vías respiratorias de varias especies libera un factor que reduce la respuesta contractil del músculo liso de las vías aéreas; este factor, probablemente PGED, ha sido denominado factor de relajación derivado del epitelio (Flavahan et al., 1985; Hay et al., 1987; Montano et al., 1989). Resulta una hipótesis atractiva que el daño epitelial de las vías aéreas inducido por ozono ocasiona hiperreactividad a mediadores broncoconstrictores al deteriorar la producción o liberación

del factor epitelial de relajación. Sin embargo, algunos estudios encaminados a probar esta hipótesis han mostrado que dicho factor si se libera y es funcional aun después de la exposición de perros y cobayos a ozono (Holroyde y Norris, 1985; Jones et al., 1989).

Finalmente, algunos estudios morfológicos han mostrado que en cambios las vías aéreas superiores también presentan lesiones epiteliales ocasionadas por la exposición a 0.15 y 0.3 ppm de ozono durante 8 horas diarias, por 6 o 50 días (Harrison et al., 1987). Asimismo, se ha caracterizado el daño morfológico inducido por ozono en el epitelio traqueal de ratas expuestas aguas (3 días) y crónicamente (50 días) a 0.75 ppm de ozono. Los resultados de este estudio sugieren que el epitelio traqueal se adapta a la exposición prolongada de ozono con excepción de la formación de cilios en las células ciliadas (Nilula et al., 1988).

Inflamación de las vías aéreas.

Otros mecanismos que tienden a explicar la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por ozono involucran factores neurohumorales y mediadores inflamatorios derivados de la oxidación de componentes de la membrana plasmática o liberados por células inflamatorias atraídas al sitio del daño (Cross et al., 1978; Reid, 1978; Shihata y Gold, 1987). La aparición de células inflamatorias en las vías aéreas consecuente a la exposición a ozono se ha confirmado al encontrar un mayor número de leucocitos polinucleares (PMN) en el fluido del lavado broncoalveolar (Spletzer et al., 1981) y en las biopsias traqueales (Doffin et al., 1982; Holtzman et al., 1983) de animales expuestos únicamente a ozono. Ya que la presencia de neutrófilos significa el desarrollo de inflamación aguda, la hiperreactividad inducida por ozono puede depender de la presencia de inflamación aguda de las vías aéreas. Las células involucradas en la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por ozono son fuente de muchos mediadores bioactivos incluyendo enzimas lisosomales y leu-

cotrienos (Lewis y Austun, 1981; Miller et al., 1987). Estos mediadores tienen un amplio rango de efectos fisiológicos por lo que pueden contribuir a la reacción pulmonar al ozono alterando la respuesta del músculo liso a estímulos neurales y humorales.

a) Alteración de la población de leucocitos polimorfonucleares. Varios estudios recientes han mostrado que la hiperreactividad bronquial inducida por ozono está asociada con un aumento del número de neutrófilos contenidos en el fluido del lavado broncoalveolar tras la exposición a ozono en varias especies de mamíferos como ovejas, perros, cobayos, ratas y humanos (Bilicikan et al., 1983; Holtzman et al., 1987; Fabbri et al., 1984; O Byrne et al., 1984; Murias y Roum, 1985; Sellner et al., 1984; Bennett et al., 1985; Graham et al., 1985; Baron et al., 1987; McDonnell et al., 1990).

Se ha considerado que los PMN juegan un papel mecánico en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono ya que ésta disminuye significativamente en perros y el influxo de PMN en la pared bronquial se abolio inmediatamente después del tratamiento con hidrocortisona (O Byrne et al., 1984). Sin embargo, por otro lado se ha sugerido que la infiltración neutrofilica es una consecuencia del daño epitelial de las vías aéreas que una consecuencia del incremento de la reactividad bronquial tras la exposición a ozono, ya que en cobayos esta no es inhibida por la depleción de PMN con ciclofosfámido y se la observa después de la primera fase de daño de la mucosa epitelial y de la infiltración de células oscuras (Lee y Murias, 1985; Murias y Roum, 1985). En base a estas diferentes observaciones se ha sugerido que el efecto del ozono puede ser causado por diferentes mecanismos dependiendo de la especie. El incremento de los niveles de células inflamatorias tras la exposición a ozono se ha asociado con algunos marcadores bioquímicos que pueden actuar como factores quimiotácticos o reguladores en una respuesta inflamatoria como la

prostaglandina E₂. moléculas asociadas con la quimiotaxis, enzimas capaces de dañar los tejidos alrededores y proteínas importantes en el proceso fibrotico y fibrinolítico del pulmón (Moron et al., 1989; McDonnell et al., 1990).

b) Participación de los metabolitos del ácido araquidónico. Se han realizado diversos estudios tendientes a determinar la participación de los productos de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa como potenciales mediadores inflamatorios asociados con la hiperreactividad bronquial inducida por ozono. Al actuar directamente sobre el músculo liso. Los resultados de esos estudios sugieren que la hiperreactividad bronquial inducida por ozono puede ser causada por diferentes mecanismos en diferentes especies de mamíferos. En cobayos se ha observado que los leucotrienos, en particular el L₄, participan en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por ozono ya que esta es inhibida por antagonistas de los receptores a leucotrienos o inhibidores de la síntesis de los mismos (Lee y Murias, 1988; Murias y Lee, 1988). Sin embargo, también existen estudios descartando su participación (McIntyre y Norris, 1988), o descartando una relación causal entre el incremento de los niveles de TXA₂, PGE₂ y PGE₁ y la disminución relacionada observada en cobayos expuestos a ozono (Miller et al., 1987).

En contraste, en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono en perros y ratones se considera la participación de derivados de la ciclooxigenasa (O'Byrne et al., 1984; Airawa et al., 1985; Kleeberger et al., 1988). En particular se ha estudiado la participación del TXA₂ un mediador importante en la patogénesis de la hiperreactividad de las vías aéreas en mamíferos (O'Byrne y Fuller, 1989). En ratas y perros (Siri et al., 1980; Nambu et al., 1990) se ha sugerido que el TXA₂ participa en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono, mientras que se le ha descartado en la observada en ratones (Kleeberger et al., 1988).

Ya que la indomevacina no inhibe la hiperreactividad inducida por ozono en humanos se ha descartado en éstos la participación de metabolitos de la ciclooxigenasa (Coffey et al., 1990).

c) Participación de la histamina y las células cebadas. La histamina es el principal mediador de la inflamación pulmonar y es liberada de las células cebadas tanto por estímulos inmunológicos como no-inmunológicos (Gusten y Orange, 1975). La histamina liberada de las células cebadas de las vías aéreas por estímulos inmunológicos actúa directamente sobre el músculo liso bronquial para incrementar el tono e indirectamente al estimular receptores sensoriales vagales de las vías aéreas causando broncoconstricción refleja (Bouney et al., 1981). Por ello algunos estudios han explorado la posibilidad de que los mediadores de las células cebadas como la histamina se liberen en el pulmón durante la exposición a ozono y contribuyan a incrementar la reactividad de las vías aéreas. Ya que la administración de clorfeniramina (antagonista H1) disminuyó el incremento tardío de la resistencia pulmonar inducido por ozono en perros, se ha propuesto que esa fase está relacionada con la liberación de histamina (Sutner et al., 1981; Eisenberger et al., 1989). Asimismo, en ovejas y cobayos expuestos a 0.5 y 3 ppm de ozono durante 2 horas se ha observado un aumento significativo de las células cebadas pulmonares y del epitelio de las vías aéreas (Sidelich et al., 1983; Muelias y Roum, 1985). Estos hallazgos sugieren que un daño oxidativo y probablemente no-inmunológico, como el ozono, puede ser quimiotáctico para las células cebadas. La exposición de cobayos conscientes a 1.0 ppm de ozono produjo una disminución de la histamina pulmonar que no se amplió por la inducción de edema o citotoxicidad de las células cebadas. Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que el daño oxidativo del ozono genera agentes químicos que induzcan la secreción de histamina (Shields y Cold, 1987). Otros mediadores preformados liberados por las células cebadas son los

factores quimiotácticos de neutrófilos y eosinófilos. Estas células inflamatorias atraídas a las vías aéreas pueden contribuir al incremento de la reactividad bronquial.

Mecanismos neurales

Varios estudios en animales y humanos que reportan hiperreactividad bronquial tras la exposición aguda a ozono han atribuido esta respuesta a que el ozono, al dañar el epitelio de las vías aéreas podría incrementar la reactividad bronquial al incrementar el acceso o sensibilidad de los receptores sensoriales vagales responsables de iniciar la broncoconstricción refleja a los irritantes inhalados. Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios del efecto del ozono en otras respuestas fisiológicas respiratorias que son afectadas por actividades similares. Igual. Desde 1975, se observó que en humanos la exposición a ozono causa respiración rápida y somera durante el ejercicio, un efecto que también se observa durante la estimulación de los receptores sensoriales vagales (Folinsbee et al., 1975). Un patrón de respiración similar es inducido por histamina y aumentado por efecto del ozono en perros; también en esta especie el ozono aumenta la frecuencia pulmonar; ya que ambos efectos son abolidos por el silenciamiento de los nervios vagos, por vagotomía y/o por la administración de atropina. Se ha sugerido que las respuestas pulmonares al ozono están mediadas por el sistema parasimpático al aumentar la actividad de las aferentes vagales de las vías aéreas con la consecuente liberación de acetilcolina (Lee et al., 1977, 1977; Gartner et al., 1983). La observación de que el incremento que causa el ozono sobre la broncoconstricción inducida por histamina también es inhibida por atropina ha sugerido un mecanismo similar de la acción del ozono en humanos (Golden et al., 1978; Holtzman et al., 1979; Dimeo et al., 1981).

Sin embargo, se ha observado que el ozono incrementa la reactividad bronquial tanto a la acetilcolina como a metacolina; ya que esta parece inducir directamente la contracción del

músculo liso de las vías aéreas, se ha propuesto que el ozono también incrementa la sensibilidad colinérgica posganglionar (Holzman et al., 1979; Dirigo et al., 1981). En este sentido, varios estudios en perros y cobayos a través de diferentes estrategias fisiológicas y farmacológicas han apoyado la hipótesis de descartar que un mecanismo reflejo parasimpático sea el adecuado para explicar la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por ozono. Así, ni el bloqueo ganglionar, ni la administración de atropina, ni la vagotomía abrieron la hiperreactividad a histamina y acetilcolina inducida por ozono (Gordon et al., 1981; Jones et al., 1987; Holroyde y Norris, 1988). En humanos, se ha propuesto que tanto un mecanismo parasimpático como uno independiente de este expliquen respectivamente el aumento de la resistencia pulmonar y los cambios en la respiración inducidos por ozono (Sodgett et al., 1988). Recientemente, un estudio en humanos ha propuesto que los cambios fisiológicos pulmonares inducidos por ozono podrían explicarse no solo por un mecanismo vagal reflejo al estimular receptores de irritación de las vías aéreas, sino también por la participación del sistema de fibras aferentes C no mielinizadas de origen vagal que podrían actuar a través de reflejos axónicos o espinales al limitar la contracción muscular inspiratoria (Ishida et al., 1987).

SISTEMA NERVIOSO NO ADRENÉRGICO-NO COLINÉRGICO EXCITATORIO, TAQUICININAS Y CONTROL DE LAS VÍAS AERIAS

El control autónomo de las vías aéreas no se explica totalmente por los efectos producidos por los nervios colinérgicos y noradrenérgicos (Nadel, 1984; Barnes, 1986). Técnicas inmunohistoquímicas modernas han revelado la presencia abundante de sustancias activas biológicamente en las estructuras nerviosas de los pulmones de muchas especies, incluyendo al hombre. De hecho, durante los años más re-

cientes se han implicado nuevos neurotransmisores en la regulación del tono bronquial, la secreción de las vías aéreas, la limpieza mucociliar, el flujo sanguíneo y la inflamación. Las investigaciones más recientes destacan la importancia de la innervación traqueobronquial no adrenergica-no colinérgica (NANC). Sin embargo, el papel definido que juegan los nervios NANC de las vías aéreas no se ha establecido. Los estudios actuales señalan particularmente a los péptidos como neurotransmisores y neuromoduladores de las vías aéreas. Algunos péptidos coexisten con los neurotransmisores clásicos de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, mientras que otros se encuentran en nervios independientes solos o en coordinación con otros neurotransmisores. Los neuropéptidos pueden estar involucrados tanto en mecanismos aferentes como eferentes. Este último aspecto está ilustrado por la actividad de fibras-D quimiosensitivas que presumiblemente se encuentran mediando reflejos de las vías aéreas como tos, estornudo y broncoconstricción (Joss et al., 1988).

La primera evidencia de la presencia de nervios NANC en la tráquea aislada de cobayo la presentaron Coburn y Tomita (1973) y Coleman (1977). En sus experimentos, la estimulación eléctrica de dicho tejido induce relajación que no fue afectada por bloqueo adrenergico-beta ni muscarínico, pero sí fue inhibida por tetrodotoxina. Un sistema nervioso inhibitorio NANC se ha demostrado actualmente en preparaciones de las vías aéreas aisladas de muchas especies incluso la humana (Joss et al., 1988). Grandstrom et al. (1981) fueron los primeros en reportar la contracción neurogénica no colinérgica de los bronquios de cobayo *in vitro*. Estudios subsiguientes han revelado que los nervios NANC broncoconstrictores también pueden ser activados *in vivo* por la estimulación eléctrica o por la inhalación de irritantes (Lundberg y Larin, 1983).

En contraste con la respuesta colinérgica, la cual es rápida en su inicio y de corta duración, la contracción neu-

rogénica no colinérgica de los bronquios de cobayo se desarrolla lentamente y se sostiene (Grundström et al., 1981; Lundberg y Saria, 1982; Karlsson y Persson, 1983). En los bronquios, el principal componente neurogénico parece ser la constricción NANC, y una innervación inhibitoria parece estar ausente. No se ha demostrado la contracción neural norcolinérgica de la tráquea de cobayo *in vitro*, y se ha propuesto que esto se debe a un enmascaramiento de la respuesta contractil por una importante inhibición NANC del músculo liso traqueal (Grundström et al., 1981; Karlsson y Persson, 1983; Lundberg et al., 1987).

La respuesta excitatoria NANC hasta ahora solo se ha demostrado en los bronquios de cobayo y está claramente ausente en otras especies de mamíferos (Andersson y Grundström, 1987). Las contracciones neurales de los bronquios humanos aislados provenientes de sujetos con y sin enfermedad de las vías aéreas se abolían completamente por bloqueo de los receptores muscarínicos (Davis et al., 1982; Taylor et al., 1984). La estimulación eléctrica de los nervios vagos de cobayos anestesiados con pulso de larga duración (5 msec) produce una broncoconstricción que es inhibida solo parcialmente por atropina y hexametonio (Lundberg y Saria, 1982). Como en los bronquios aislados, la contracción norcolinérgica se inicia lentamente y se sostiene.

La sustancia P (SP) y otras tachiquininas son los péptidos considerados como los mediadores de la broncoconstricción NANC en el cobayo. Estos péptidos están presentes principalmente en los neuronas sensoriales de las vías aéreas y son liberados por irritantes que estimulan nervios NANC, probablemente del tipo de las fibras C. Las tachiquininas como la SP, fisalargina, eladotina, neurocinina A, neurocinina B y neuro péptido II contraen el tejido traqueobronquial del cobayo dependientemente de la dosis (Hua et al., 1984; Karlsson et al., 1984; Miyata et al., 1984; Advenier et al., 1987). La magnitud de cada contracción es

comparable con la inducida por carbacol (Karlsson et al., 1984). La contracción producida por las taquicininas en el cobayo no es afectada por drogas antimuscarínicas (Goel y Biggs, 1987), mientras que es parcialmente colinérgica en el cobayo (Tanaka y Grunstein, 1984) y en el huron (Sokizawa et al., 1987).

Las vías aéreas humanas también son contraídas *in vitro* por la SP y otras taquicininas de manera similar a los bronquios de cobayo *in vitro* (Finney et al., 1985; Martling et al., 1987), excepto por la neurocinina B que no parece tener efecto (Advenier et al., 1987). Las taquicininas son, sin embargo, menos efectivas que el carbacol en los bronquios humanos (Finney et al., 1985; Black et al., 1988).

Ya que no existen antagonistas específicos, los receptores a las taquicininas se han clasificado en base a la potencia de los agonistas. Actualmente se consideran tres diferentes receptores a taquicininas: SP-F (taquicininas equipotentes), AP-E (neurocinina B, SP y fisalaemina) y SP-K (neurocinina A) (alejoiano, SP y fisalaemina). Alternativamente los receptores de taquicininas también se han clasificado de acuerdo con su ligando endógeno: SP, neurocinina A y neurocinina B (Regoli et al., 1987).

PLANIFICACION DEL PROBLEMA. OBJETIVOS E HIPOTESIS

De los efectos relacionados al asma ha llegado a ser un concepto bastante generalizado como de las áreas urbanas y suburbanas de la ciudad en donde ocurren el 80% de los casos de los pacientes asmáticos. Es un fenómeno muy complejo y debido a sus efectos sociales ha recibido atención creciente en relación con sus efectos en la salud pública, especialmente la función pulmonar.

Va que una de las características fisiopatológicas más importantes del asma es la hiperreactividad bronquial a estímulos inespecíficos y se ha demostrado que el asma incrementa considerablemente la reactividad in vivo del músculo liso de las vías aéreas en humanos y en varios mamíferos. Este fenómeno provee un modelo experimental adecuado para estudiar tanto los mecanismos que intervienen normalmente la actividad del músculo liso de las vías aéreas in vivo como los posibles mecanismos que contribuyen a las alteraciones fisiológicas que caracterizan al asma en humanos.

ESTIMULACION NO-COLINERGICA

Se ha demostrado que los nervios vagos participan en la hiperreactividad bronquial inducida por asma y que, sin embargo, existen mecanismos independientes de los receptores muscarínicos (Barnes, 1971; Barnes et al., 1973; Barnes et al., 1974; Jones et al., 1977). La liberación de las catecolaminas inducida por estimulación no colinérgica de los nervios vagos produce un incremento agudo tanto de la resistencia aérea como de la permeabilidad vascular de las vías aéreas, sugiriendo efectos importantes de los catecolaminas en el músculo liso de las vías aéreas. La activación del músculo de fibras aferentes D de decir el sistema sensorial noradrenérgico, por estimulación mecánica o química produce con este aspecto por otros mecanismos inducida por la inhalación de asma (Lundberg y Davis, 1973; Thompson et al., 1977).

El sistema objetivo de este estudio fue investigar el efecto de las alteraciones bronquiales in vivo a la reactivación bronquial hiperreactiva de las células anexas de esas células (plasma, células sensibilizadas) y en células normales. Participaron con, debido a que las reacciones con reactivación mediadoras inflamatorias y células hiperreactivas del músculo liso de las vías aéreas, el efecto bronquial hiperreactividad a las reacciones inflamatorias y mediadoras por la estimulación del sistema bronquial de-epitelial.

REACTIVIDAD A HISTAMINA IN VIVO E IN VITRO

El siguiente objetivo fue determinar el estado hiperreactor de las vías aéreas inducido por ozono estudiando la respuesta bronquial a histamina in vivo en cobayos normales y asmáticos y su correlación con el aumento de sensibilidad del músculo liso de células bronquiales in vitro. Se hipotetiza que el ozono produce hiperreactividad a histamina in vivo y que, si el efecto inducido por ozono repercute directamente sobre el músculo liso de las vías aéreas bronquiales, las tracheas aisladas también presentarían hiperreactividad a histamina.

PARTICIPACIÓN DEL EPITELIO

Ya que se ha demostrado que el ozono causa directamente el epitelio de las vías aéreas en cobayos (Muller y Mann, 1985) y este fenómeno se ha asociado con la hiperreactividad bronquial, un objetivo más de este estudio fue evaluar la participación del epitelio en células bronquiales provenientes de cobayos normales y asmáticos expuestos a ozono. Se hipotetiza que si el epitelio tiene una participación sustancial o funcional en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono, entonces manifestaría un hiperreactividad de las células bronquiales inferiores de cobayos normales y asmáticos expuestos a ozono de manera similar a la demostrada por el músculo liso del epitelio.

EFTO ANTIGENICO

Existen relaciones evidenciadas que sugieren una asociación entre los mastocitos residentes y las sensibilizaciones del asma (Daly y Ellis, 1963; Naves y Smith, 1974; Eberlein et al., 1975). Sin embargo, existen pocos estudios de los efectos del asma o la reactividad en las vías aéreas al antígeno. Por ello también fue objetivo de este estudio investigar si la hiperreactividad bronquial inducida por oxono se manifiesta en la respuesta de los eosinófilos asmáticos al otro antígeno. Se hipotetiza que ésta se incrementaría por efecto del oxono.

RESPUESTA INFLAMATORIA

Ya que existen numerosos estudios que relacionan la hiperreactividad bronquial inducida por oxono con la inflamación, en este estudio se evaluaron los cambios inducidos por la inhalación de oxono en el número de diferentes tipos celulares recuadrados por lavado broncoalveolar en personas normales y sensibilizadas y se hipotetiza que el oxono modificaría el número de los diferentes tipos celulares, principalmente de neutrófilos.

MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones Hartley machos cuya peso variaba entre 400 y 500 g. Los cobayos se criaron en condiciones estándar en cajas de madera y se alimentaron con alimento comercial disponible y agua ad libitum. Para llevar a cabo los estudios se integraron cuatro grupos de animales:

- 1) normales e inmunizables; 2) normales expuestos a ozono; 3) sensibilizados (modelo de asma experimental) y 4) sensibilizados y expuestos a ozono.

EXPOSICIÓN A OZONO

El ozono se genera en un ozonizador (Welspan Ozone System Corp., modelo T-11) y se captura en un matraz que contenía 500 ml de agua destilada a 4°C donde se disolvió hasta saturación. Posteriormente, la solución acuosa saturada de ozono se mantuvo a temperatura ambiente, se agitó constantemente y se le suministró un flujo de aire comprimido. En estas condiciones, el ozono se desprendió y se hizo pasar a una cámara de exposición de plástico sellada herméticamente, a una velocidad de flujo de 2 l/min. La concentración de ozono dentro de dicha cámara se reguló disminuyendo o aumentando el flujo de aire y se mantuvo constantemente con un analizador ultravioleta de ozono (Beckit, Environmental Corp., modelo 100A Art). Los cobayos, Lemtortics y respirando espontáneamente, se expusieron a 1.0 ± 0.2 ppb de ozono a la aire (control) durante una hora, y se sacrificaron 15 horas después.

PROCEDIMIENTO DE SENSIBILIZACIÓN

Los cobayos se colocaron en una caja de acrílico sellada (VICTOR) y se les suministró la proteína purificada por un nebulizador Becton Dickinson partículas de 7 a 9 μ m de diámetro y caudal: flujo de 2 l/min. El primer día de inmunización se nebulizaron con 500 μ g de ovalbumina como

solución y 4 ml de solución de penicilina penicilina inyectable por cada cinco segundos. Sehan disueltos en 50 ml de solución salina al 0.9%. Una semana después, la intubación se reforzó con nebulizaciones diarias de 70 mg de ovalbúmina disuelta en 20 ml de solución salina durante dos semanas más. Los animales sensibilizados de acuerdo con el método de Vargas et al. (1967) se sacrificaron 3 a 7 días después de la última nebulización.

ESTUDIOS IN VIVO

Previo a uno de 4 a 6 horas, los cobayos se anestesiaron con 35 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal, y se mantuvieron bajo anestesia con dosis continuas de 7 mg/kg de pentobarbital por vía intravenosa cada hora. Se disecaron la vena yugular derecha y la arteria pulmonar y se conectaron con sondas de polietileno de 0.20 y 0.25 mm de diámetro interno respectivamente. A nivel de la arteria pulmonar izquierda se registró la presión arterial con un transductor Beckman 4-107-0109. Mientras que a través de la vena yugular derecha se administraron los fármacos. Se disecó la tráquea y se conectó con una sonda de 1.77 mm de diámetro interno, para a través de ella ventilar artificialmente a los cobayos con un ventilador Harvard Apparatus Ltd., modelo 50-17001 a un volumen respiratorio alrededor de 10 ml/kg y una frecuencia respiratoria de 70 respiraciones. Todas los cobayos recibieron 0.06 mg/kg i.v. de heparina de pentaceno para disminuir los movimientos respiratorios espontáneos.

La presión de inflación pulmonar se midió con un transductor de heparinasa (Ugo Solino, modelo 7020) conectado a una sonda lateral de la cámara endotraqueal. El incremento de la presión de inflación pulmonar se evaluó como porcentaje de la obstrucción máxima obtenida con la solución hipertónica de la sonda endotraqueal.

Estimulación vagal experimental

En la administración de 2 mg/kg i.v. de atropina, ambos nervios vagos demostraron un aumento simultáneo, se colocaron en el sistema de cables (cable-grama) y se cubrieron con parafina. Para evitar cualquier lesión eléctrica de los vasos el estímulo se procedió hacia el sistema de cables control. El sistema-estímulo de cada nervio fue aislado con hilo seda y lesionada cuidadosamente. La dosis de atropina usada fue suficiente para bloquear completamente la broncodilatación inducida por una dosis submáxima de acetilcolina (70 μ g/kg). La estimulación vagal eléctrica se llevó a cabo con un estimulador Mark-III, modelo SI-10. Cada estímulo tuvo una duración de 10 ms con picos de 7.5 V, 0.4 ms, frecuencias de 3.125 a 4 Hz; estas variaciones con las apropiadas para inducir una respuesta norcolinérgica óptima, es decir broncodilatación que no es antagonizada por atropina (Montano et al., 1969). Se construyeron curvas dosis-respuesta. Después de cada estímulo eléctrico inductor de broncodilatación, se aumentó el volumen de ventilación (2 ml) hasta la saturación de la presión de insuflación basal.

Respuesta a la atropina

Trenta minutos después de la estimulación vagal norcolinérgica, se construyeron curvas dosis-respuesta a sistémica la cual se administró intravenosamente a dosis crecientes (0.05 - 1.5 μ g/kg) en intervalos de 10 min.

Curva antídoto

Se llevó a cabo administrando 10 μ g/kg i.v. de atropina a los cobayos sensibilizados. El incremento en la presión de insuflación máxima producida por el caso antídoto se comparó con el de la curva de los siguientes, entre otros, tiempos de 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 y 15 min con un pleumógrafo digital (Hansy, Píscua 2). Cada prueba se

después de la adición de la solución testada para el intervalo de tiempo deseado. También se midió el tiempo de latencia, es decir, el tiempo transcurrido desde la administración de histamina hasta el comienzo de la respuesta.

ESTUDIOS IN VITRO

Los tejidos se seccionaron por disección cervical y se empaquetaron en envases de las traqueas y se diseñaron de tejido conectivo. Para formar las radulas de traqueas estas se cortaron longitudinalmente a través del cartilago y posteriormente se hicieron cortes transversales obteniéndose 4 fragmentos distintos cada uno de 2 anillos cartilagineos. De cada traquea se obtenieron 2 cadenas compuestas cada una de dos fragmentos tanto cervicales como torácicos para eliminar posibles diferencias en reactividad originadas por variaciones regionales. El epitelio de una de las 2 cadenas se removió frotando suavemente la superficie luminal con un hisopo de algodón humedecido; la porción epitelial se ha corroborado histológicamente en un estudio previo (Hartley et al., 1973). Cada cadena se fijó en una cámara de difusión aislada que contenía 10 ml de solución buffer bicarbonato cuya composición (mM) fue la siguiente: NaCl 136, KCl 4, NH₄Cl 2, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.5, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 1.5 y glucosa 11. Esta solución se ajustó a 37°C y a pH de 7.4 con burbujas constantes de una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de óxido de carbono. La tensión iónica se registró en un sistema Beckman 8611 a través de un transductor de la Electrode Unit. Para sensibilización, los tejidos se colocaron a una tensión basal de 1 g durante una hora y se lavaron con solución fresca tres veces cada 15 minutos. Se construyeron curvas acumulativas concentración-respuesta a histamina lo cual se añadió a la solución (de la cámara de difusión aislada) en concentraciones sucesivas (1 a 10⁻⁷ - 1 a 10⁻⁸ M) hasta 15 min. La respuesta cívica. De cada cadena torácica se obtuvo solamente una curva.

TECNICAS BRONCOALVEOLARES

Las cobayas se anestesian con pentobarbital (10 mg/kg. i.p.). Se divide la muestra y se coloca una cámara endotraqueal a través de la cual se instilará 5 ml de solución salina a 37°C. De este volumen se recupera aproximadamente 75 a 80% al aspirar suavemente durante de un minuto. Esta aspiración se repite una vez. La mitad del volumen del fluido broncoalveolar recuperado aproximadamente 1 ml se mezcla con 99 volúmenes de líquido y se centrifuga para remover el exceso de surfactante y del suero celular se realiza el frotis que se tiñe con hemateína y eosina para realizar el conteo celular diferencial. La otra alícuota se centrifuga a 500 x g a 4°C durante 10 min. El suero celular se congelará en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos; de este volumen se tomó una alícuota de 20 μ l que se mezcló con el mismo volumen de azul de tripano al 0.4% para evaluar la viabilidad por la prueba de exclusión. El conteo de células totales se realizó en un hemocitómetro de Neubauer.

ANÁLISIS DE DATOS

Para evaluar la estimulación vagal no colinérgica y la reactividad a histamina in vivo se calcularon el estímulo eléctrico medio (EE_{50%}) y la dosis de histamina efectiva media (DE_{50%}) respectivamente mientras que para evaluar la reactividad a histamina in vitro se calcularon la concentración de histamina efectiva media (HE_{50%}) y la concentración máxima. Los valores efectivos medios se definen como el estímulo eléctrico, la dosis de histamina y la concentración de histamina necesaria para inducir el 50% de la respuesta máxima observada. Estos valores se calcularon por medio de la ecuación lineal al graficar los valores logarítmicos de la concentración de histamina, la dosis de histamina o la concentración de histamina versus los valores de las respuestas convertidos a unidades normalizadas (arcsen). Las comparaciones entre grupos se

indican los datos estadísticos para el CMA, y las series descriptivas para la DCA, y la CMA, así como la conversión de las unidades de potencia de tensión.

Para el análisis estadístico se usaron pruebas de comparación múltiples mediante el análisis de varianza de una vía y método de Tukey (W. L. Brown, 1955) y prueba de t de Student para series de muestreo (Tullerida y Sierra, 1987). El nivel de significancia se fijó en valores de $\alpha = 0.05$ uniserial. Los datos en el texto y las figuras constituyen los valores promedio \pm el error estándar de la media.

RESULTADOS

ESTIMULACION NO-COLINERGICA

La estimulación de los nervios vagos de cobayos anestesiados, curalizados mecánicamente y tratados con atropina provoca un incremento en la presión de insuflación pulmonar que depende de la frecuencia de los impulsos (Figura 1, izquierda). En los cobayos normales o no sensibilizados el estímulo efectivo medio fue de 0.313 ± 0.042 Hz. Las curvas estímulo-respuesta de los cobayos normales expuestos a cromo así como de los sensibilizados se desplazaron hacia la izquierda y en ambos el estímulo efectivo medio disminuyó significativamente (0.313 ± 0.070 Hz, $p=0.001$; 0.180 ± 0.021 Hz, $p=0.042$, respectivamente). Sin embargo, el grupo de cobayos sensibilizados y expuestos a cromo presentó una curva estímulo-respuesta desplazada a la derecha con un estímulo efectivo medio significativamente mayor (0.574 ± 0.057 Hz) que el de los sensibilizados ($p=0.009$) y que el de los normales expuestos a cromo ($p=0.005$) (Fig. 1, derecha).

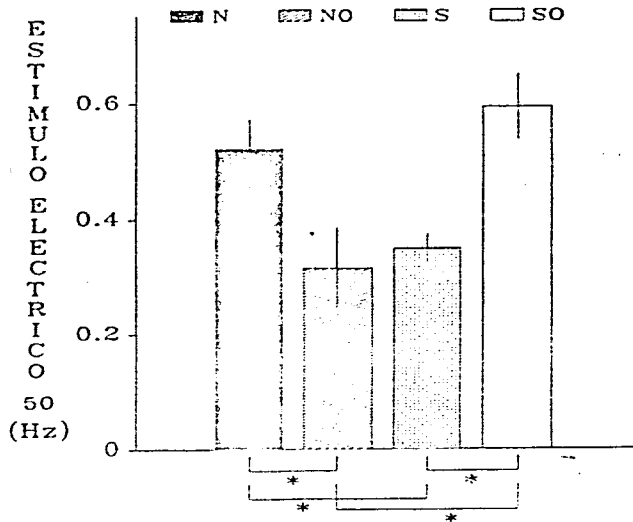
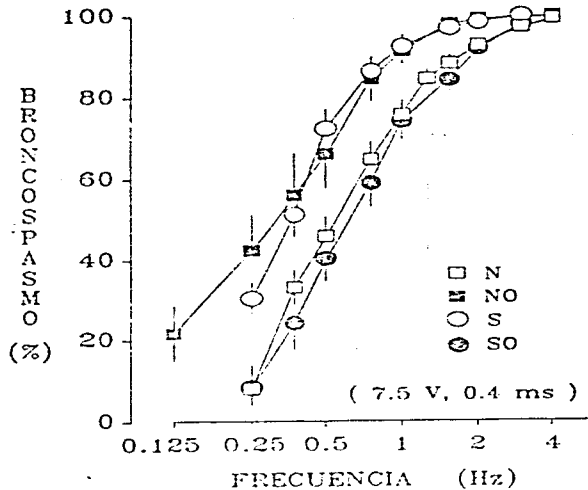


FIGURA 1. Izq.: Curvas frecuencia-respuesta a la estimulación vagal eléctrica antidrómica de cobayos, 16 horas después de la exposición a ozono ó a aire. Los valores representan el promedio \pm el error estándar ($n=6-7$ por grupo). Der.: Comparación estadística de los valores promedios del estímulo eléctrico 50 correspondientes a las curvas de la izquierda. El asterisco indica $p < 0.05$. N=normales; NO=normales expuestas a ozono; S=sensibilizados; SO=sensibilizados expuestos a ozono.

REACTIVIDAD A HISTAMINA IN VIVO

Se obtuvieron curvas dosis-respuesta a histamina administrada intravenosamente para todos los grupos. La dosis efectiva media (ED_{50}) expresada como el logaritmo negativo para los cobayos normales fue de 3.9715 ± 0.0819 . La curva obtenida para los cobayos sensibilizados no se modificó respecto de los normales, lo cual indica que el procedimiento de sensibilización no afectó la reactividad de las vías aéreas a histamina ($-\log DE_{50}$ 3.7387 ± 0.0522 , $p=0.1$). La exposición a ozono causó un desplazamiento a la izquierda de las curvas de cobayos normales y sensibilizados, es decir se observó hiperreactividad a histamina inducida por ozono. Los valores del $-\log DE_{50}$ fueron 4.4035 ± 0.0042 ($p=0.001$) y 4.0507 ± 0.711 ($p=0.032$) para normales y sensibilizados ambos expuestos a ozono respectivamente. La asociación entre los normales y los sensibilizados ambos expuestos a ozono señala que los normales fueron más reactivos a la histamina que los sensibilizados ($p=0.013$) (Figura 2).

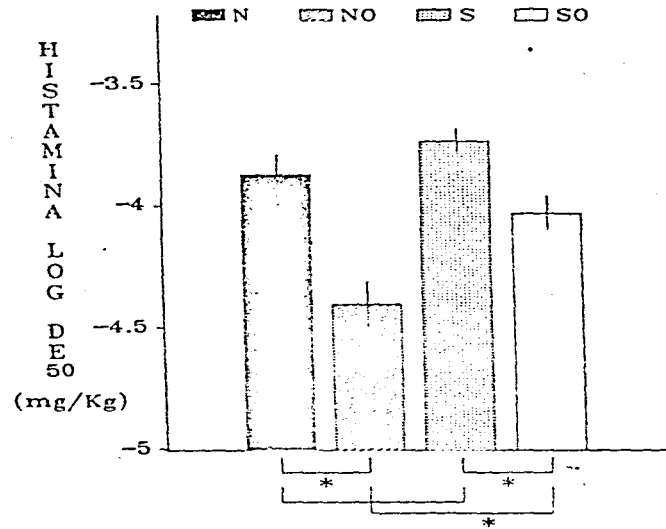
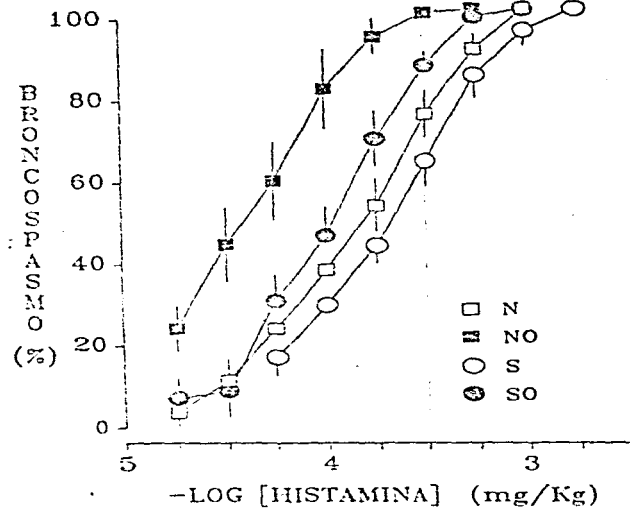


FIGURA 2. Izq.: Curvas dosis-respuesta a histamina de cobayos, 16 horas después de la exposición a ozono 6 a aire. Los valores representan el promedio \pm el error estándar (n=6-7 por grupo). Der.: Comparación estadística de los valores promedios de la dosis efectiva 50 correspondientes a las curvas de la izquierda. El asterisco indica $p < 0.05$. N=normales; NO=normales expuestos a ozono; S=sensibilizados; SO=sensibilizados expuestos a ozono.

SENSIBILIDAD A HISTAMINA IN VITRO

La reacción mecánica del epitelio provoca que las curvas concentración-respuesta acumulativas a histamina correspondientes a las cadenas traqueales provenientes de cobayos normales y sensibilizados se desplazan a la izquierda, como ya ha sido descrito por Montano et al. (1968), con el consecuente incremento significativo de los valores del logaritmo negativo de la concentración molar efectiva media: 5.0475 ± 0.06915 y 5.7242 ± 0.1434 ($p < 0.001$) para traqueas con y sin epitelio de animales normales respectivamente; 4.9396 ± 0.0620 y 5.6127 ± 0.0883 ($p < 0.001$) para traqueas con y sin epitelio de animales sensibilizados respectivamente (Figuras 3 y 4).

La exposición a ozono no modifica la respuesta a histamina de traqueas con y sin epitelio provenientes de animales normales y sensibilizados. (Tabla 1). 5.1075 ± 0.0616 y 5.0485 ± 0.1151 para traqueas con y sin epitelio de cobayos normales expuestas a ozono; 4.9371 ± 0.1478 y 5.7050 ± 0.0472 para traqueas con y sin epitelio de cobayos sensibilizados expuestas a ozono (Figuras 3 y 4).

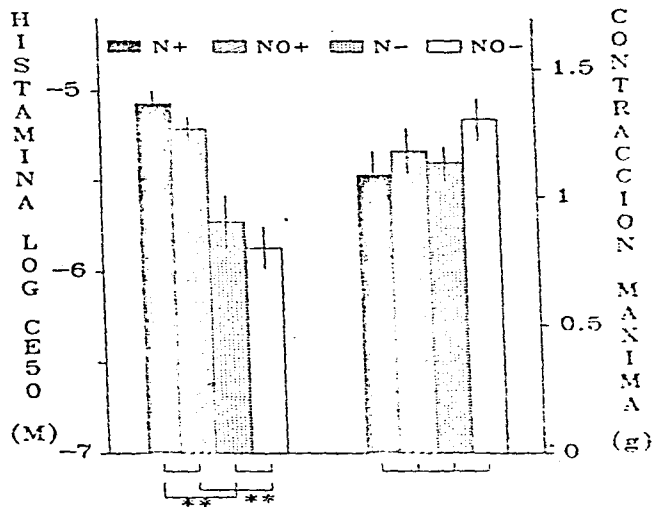
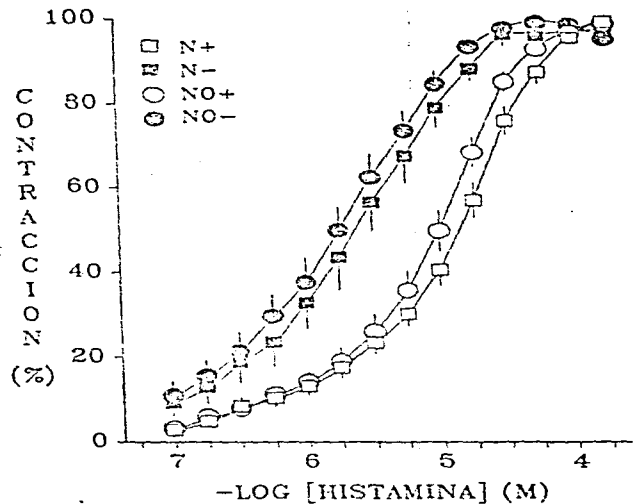


FIGURA 3. Izq.: Curvas concentración-respuesta a histamina de tráqueas de cobayos normales 16 horas después de la exposición a ozono ó a aire. Los valores representan el promedio \pm el error estándar ($n=8$ por grupo). Der.: Comparación estadística de los valores promedios de la concentración efectiva 50 y la contracción máxima correspondientes a las curvas de la izquierda. El doble asterisco indica $p < 0.001$. N+=normales con epitelio; N-=normales sin epitelio; NO+=normales expuestas ozono con epitelio; NO-=normales expuestas a ozono sin epitelio.

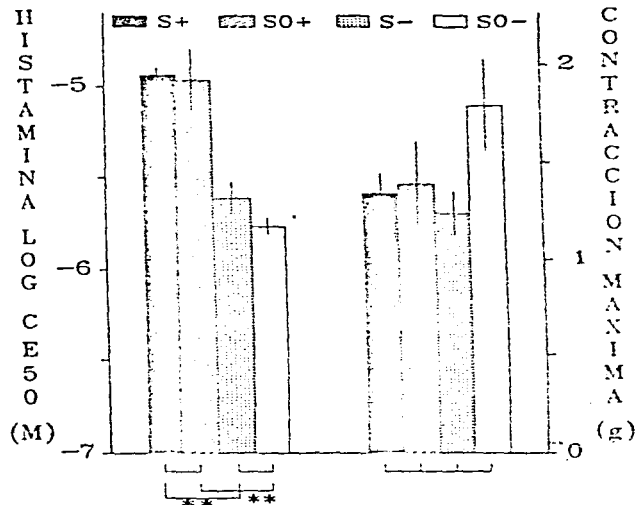
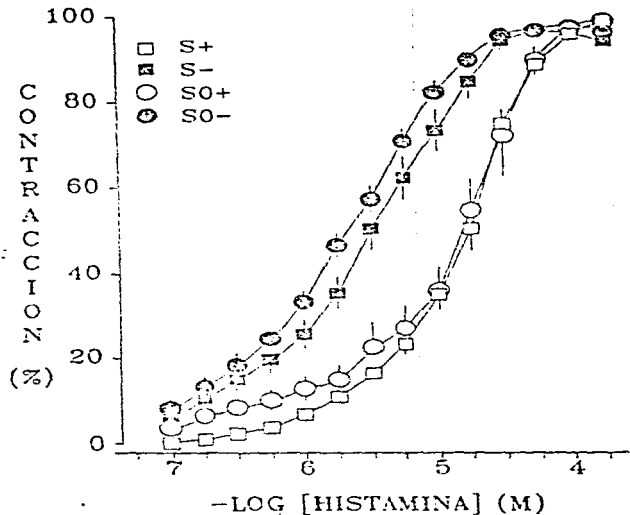


FIGURA 4. Izq.: Curvas concentración-respuesta a histamina de tráqueas de cobayos sensibilizados, 16 horas después de la exposición a ozono ó a aire. Los valores representan el promedio \pm el error estándar (n=8 por grupo). Der.: Comparación estadística de los valores promedios de la concentración efectiva EC_{50} y la contracción máxima correspondientes a las curvas de la izquierda. El doble asterisco indica $p < 0.001$. S+=sensibilizadas con epitelio; S-=sensibilizadas sin epitelio; SO+=sensibilizadas expuestas a ozono con epitelio; SO-=sensibilizadas expuestas a ozono sin epitelio.

EFECTO ANTIGENICO

La administración intravenosa de 0.05 mg/kg de ovalbumina a cobayos sensibilizados produjo un incremento en la presión de insuficiencia pulmonar de aproximadamente 40% de la construcción normal (Figura 5). La exposición a ozono produjo un incremento de la respuesta de presión de insuficiencia pulmonar inducida por el antigéno. La comparación entre los grupos muestra una diferencia significativa a partir de los 8 minutos en adelante ($p < 0.047$ a $p < 0.001$). La exposición a ozono también redujo el tiempo de latencia de 222.04 ± 50.87 seg a 81.67 ± 20.29 seg ($p < 0.01$).

LAVADOS BRONCOALVEOLARES

La exposición a ozono no modificó el número total de células, ni el de macrófagos y linfocitos en ninguno de los grupos, es decir normales y sensibilizados. En cambio, el ozono causó un incremento en el número de neutrófilos recuperados en los lavados broncoalveolares de los sensibilizados ($1.320 \pm 0.422 \times 10^4$ células/ml) en comparación con los animales normales no expuestos a ozono ($0.190 \pm 0.000 \times 10^4$ células/ml; $p < 0.023$). Sin embargo, en los cobayos sensibilizados el tipo celular modificados cuantitativamente por efecto del ozono fue el de los eosinófilos ($1.256 \pm 0.494 \times 10^4$ células/ml versus $0.543 \pm 0.100 \times 10^4$ células/ml; $p < 0.03$). El procedimiento de sensibilización produjo un incremento en el número de neutrófilos recuperados ($1.177 \pm 0.245 \times 10^4$ células/ml; $p < 0.01$).

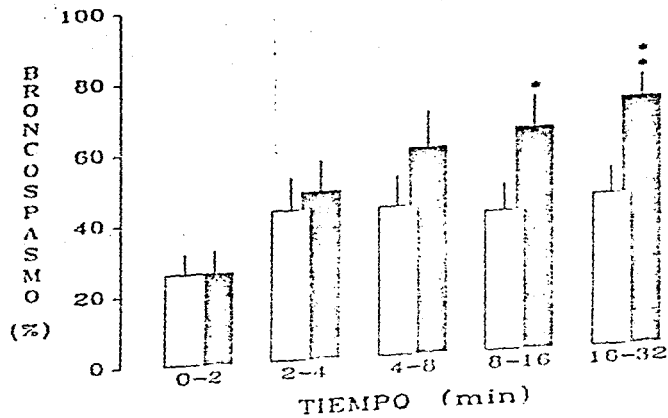


FIGURA 5. Respuesta al reto antigénico inducido por ovoalbúmina en cobayos sensibilizados 16 horas después de la exposición a ozono (barras negras) & a aire (barras blancas). Las líneas verticales representan el error estándar de la media (n=6 por grupo). El asterisco simple indica $p < 0.05$ y el doble, $p = 0.001$.

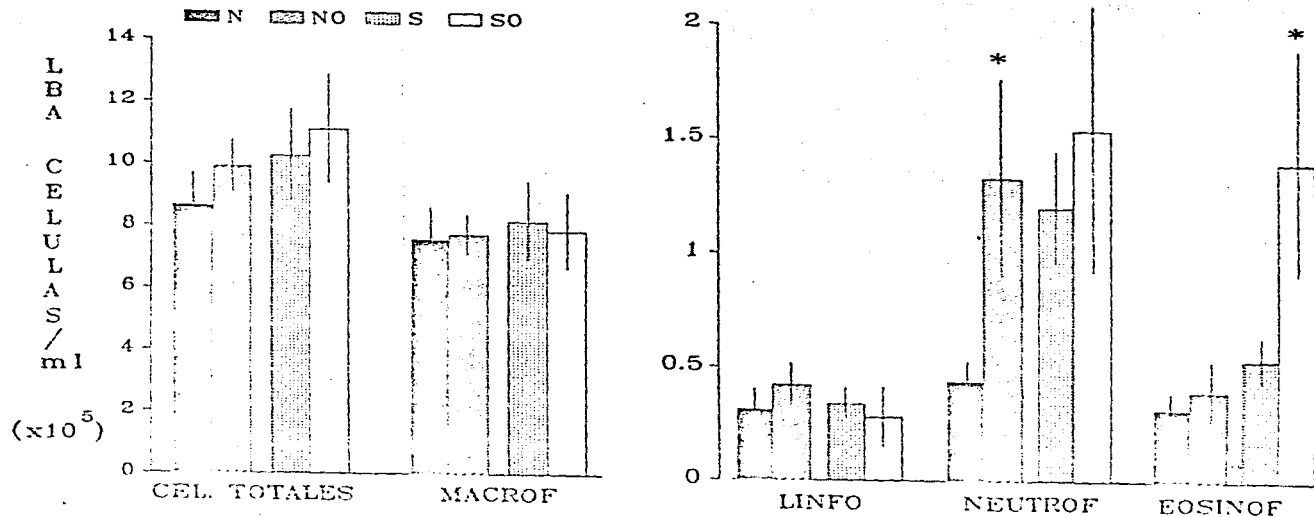


FIGURA 6. Conteos de leucocitos totales y diferenciales del fluido broncoalveolar proveniente de cobayos 16 horas después de la exposición a ozono ó a aire. Las líneas verticales representan el error estándar de la media (n=6 por grupo), y el asterisco indica $p < 0.05$ comparado con el control. N=normales; NO=normales expuestos a ozono; S=sensibilizados; SO=sensibilizados expuestos a ozono; macrof=macrófagos; linfo=linfocitos; neutrof=neutrófilos; eosinof=eosinófilos.

D I S C U S I O N

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LA ESTIMULACION NO-COLINERGICA

Los resultados de estos experimentos muestran que la exposicion a ozono produce hiperreactividad de las vias aereas a la estimulacion electrica aferente norcolinergica de los nervios vagos de cobayos normales anestesiados y ventilados mecanicamente. Es decir, el ozono aumenta la broncoconstriccion inducida por la liberacion de tachicardinas endogenas por estimulacion electrica retrograda de los nervios vagos. El mecanismo que sobrevive a la broncoconstriccion inducida por la estimulacion electrica de los aferentes vagales en cobayos controlados con atropina es la liberacion de tachicardinas, como la sustancia P, de las ramas periféricas de neuronas sensoriales de el musculo liso bronchial.

La excitacion de una poblacion de fibras E sensibles a capsaicina causa broncoconstriccion y aumento de la permeabilidad vascular (Lundberg y Eric, 1965; Lundberg et al., 1967). La broncoconstriccion inducida por animales pretratados previamente con capsaicina es sistémica o localmente a los nervios vagos así como por la administracion de analoga de la sustancia P con propiedades antagónicas a las tachicardinas (Lundberg y Eric, 1967). La presencia de la broncoconstriccion no colinergica inducida por estimulacion vagal es relativamente facil de demostrar en el cobayo porque es parcialmente debido a que el sistema inhibitorio noradrenergico en las vias aereas de esta especie se encuentra limitado a la tráquea (Anderson y Grundstrom, 1967).

Una explicacion de la habilidad de las aferentes estimuladas antidromicamente para inducir una accion aferente puede ser el arriego de un reflejo sensorial local: la estimulacion de nervios sensoriales no solo inicia impulsos ortodromicos que viajan aferentemente en la medula espinal, sino que tambien produce impulsos antidromicos que se difunden a través de las arborizaciones terminales o

colaterales adicionales de los nervios sensoriales. Este reflejo local permite la conducción de potenciales de acción de nervios aferentes a nervios NANC aferentes sin la participación del sistema nervioso central ni los ganglios autónomos periféricos. La sustancia P y péptidos relacionados que se encuentran en esos terminales nerviosos son así liberados por estimulación antidrómica.

A diferencia de los estudios que han adjudicado a mecanismos colinérgicos locales la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por asma (Emsw et al., 1976; Golden et al., 1978; Helmsen et al., 1979), otros estudios han dejado entender que en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por asma podría participar algún mecanismo adicional e diferente al reflejo vagal. Gertner y col. (1980) demostraron el papel de la actividad parasimpática en la respuesta aguda al asma de las vías aéreas periféricas de perros anestesiados. Sin embargo, la vagotomía cervical bilateral o el prostiguerina con atropina inhibieron el aumento de la resistencia bilateral de las vías aéreas inducido por asma que se observó a los 2 minutos pero no a tiempos mayores, por lo que concluyeron que solo el inicio de la respuesta a 1 hora de asma está mediado por el sistema parasimpático. En humanos, Eccleff et al. (1985) han sugerido que el aumento de la resistencia pulmonar durante la exposición a asma está mediado tanto por un mecanismo parasimpático como por vías mecánicas que no están relacionadas con receptores colinérgicos. Jones et al. (1987) concluyeron de sus estudios que la hiperreactividad de las vías aéreas exagerada en perros tras la exposición a asma no se amplifica a través de un mecanismo reflejo parasimpático ya que no se inhibió por el bloqueo ganglionar. Holroyde y Honick (1988) demostraron que un reflejo vagal fuera el mecanismo de la hiperreactividad a metacolina inducida por TBS por el asma en cobayos.

Al comparar los estudios arriba señalados y la observación de la hiperreactividad de las vías aéreas a la

estimulación nor-colinérgica inducida por ozono en cobayos normales tratados con atropina se sugiere la participación del sistema contractil nor-colinérgico en la hiperreactividad inducida por ozono como un mecanismo causal. Aunque, desde luego, este estudio solo lo muestra como un mecanismo efector. Esta propuesta se apoya también en las siguientes observaciones. En los cobayos se ha observado que las respuestas broncoconstrictoras agudas a una gran variedad de irritantes inhalados, incluyendo el humo del cigarrillo y el éter, así como la capsaicina, se deben en gran medida a la liberación de taquicinas endógenas (Thompson y Sheppard, 1968). El humo del cigarrillo produce inflamación neurogénica de las vías aéreas del cobayo por la liberación de taquicinas endógenas (Lundberg et al., 1968). En el caso del picado de la tripluca, otro agente tóxico que también causa hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo, se ha adjudicado a las taquicinas un papel causal en la hiperreactividad observada (Thompson et al., 1967). Recientemente Harache et al. (1969) han propuesto que los cambios en la función pulmonar inducidos por ozono en humanos se deben a que el principal efecto del ozono es la estimulación del sistema de fibras II, el cual puede actuar a través de reflejos eferentes e aferentes para limitar la contracción muscular respiratoria.

Por otro lado, en los estudios de regulación de la función de las vías aéreas hay que considerar no solo a los mediadores químicos que inducen la respuesta fisiológica, sino también el metabolismo de los mismos. Una vez que las taquicinas son liberadas se unen a receptores específicos que median sus efectos (Ison et al., 1968). Estas tienden a ser rápidas y pasajeras (Striner-Sevard, 1967; Thompson y Sheppard, 1968) lo cual ha sugerido una inactivación rápida y específica de las taquicinas que podría estar limitando su potencia contractil in vivo (Shore et al., 1968). Recientemente se ha observado que la sustancia P es sustrato de la endopeptidasa neutra del riñón humano, una enzima que

originalmente se caracterizó por su habilidad para degradar endocinas (Sridgel et al., 1984). La actividad de la endopeptidasa neutra se ha identificado en varios tejidos incluyendo las vías aéreas humanas (Stimier-Bernard, 1987; Serrano et al., 1987; Boreon et al., 1987). Asimismo se ha propuesto que la endopeptidasa neutra desempeña un papel importante en la modulación in vitro e in vivo de las respuestas broncoconstrictoras a las tachiquininas en cobayos (Stimier-Bernard, 1987; Shore et al., 1988; Thompson y Sheppard, 1988; Frossard et al., 1989). Ya que las tachiquininas regulan la broncoconstricción a diversos irritantes inhalados, las alteraciones en la concentración o actividad de la endopeptidasa neutra pueden afectar la respuesta de las vías aéreas a los agentes ambientales, y podría observarse la potenciación de los efectos fisiopatológicos de las tachiquininas liberadas endógenamente.

En efecto se ha propuesto que el humo del cigarrillo causa hiperreactividad bronquial a la sustancia E in vivo en el cobayo al igual que endopeptidasa neutra del epitelio de las vías aéreas probablemente como resultado de la acción de radicales libres derivados del cigarrillo (Dusser et al., 1989). En un estudio reciente también se ha observado que el óxido nítrico interactúa con la sustancia E del músculo liso de las vías aéreas in vitro del cobayo, y se ha sugerido que el óxido nítrico potencialmente la endopeptidasa neutra del epitelio de las vías aéreas (Mullas et al., 1990). En resumen, de acuerdo con los estudios mencionados y los resultados de este estudio puede sugerirse que en la hiperreactividad bronquial inducida por humo participa el sistema contráctil no-colinérgico y que el óxido nítrico induce liberación de tachiquininas de las fibras aferentes C al mismo tiempo que inhibe su degradación al interferir con la actividad de la endopeptidasa neutra. Ya que las tachiquininas, por efecto del humo, pueden permanecer activas en el músculo liso bronquial por lapsos prolongados y de esta manera propiciar hiperreactividad de las vías

aerreas y pueden, asimismo, dar lugar a la liberación de mediadores inflamatorios inductores o potenciadores de la hiperreactividad de las vias aereas. es factible su participacion como uno de los eslabonos causales de la hiperreactividad de las vias aereas inducida por ozono.

EFFECTO DEL OZONO EN LA REACTIVIDAD A HISTAMINA IN VIVO E IN VITRO

La exposicion a ozono en las condiciones de este estudio produjo hiperreactividad de las vias aereas a histamina en los cobayos anestesiados y ventilados mecanicamente tanto normales como sensibilizados pero no aumento la respuesta contractil a histamina de las traqueas aisladas de cobayos normales o sensibilizados.

La hiperreactividad bronquial a histamina inducida por ozono en los cobayos anestesiados 10 horas despues de la exposicion fue un efecto constante, es decir todos los animales estudiados en ese lapso manifestaron hiperreactividad a histamina administrada intravenosamente. Esto es relevante porque, aunque algunos estudios (como en cobayos como en otros mamiferos no han realizado inmediatamente o 2 horas despues de la exposicion a ozono (Holzman et al., 1930; Morita y Roux, 1933; Holwaye y Norris, 1933) e incluso se afirma que la hiperreactividad inicial se reduce con el tiempo (Holzman et al., 1933), Roux y Morita (1934) han señalado que la frecuencia y curso temporal de la hiperreactividad inducida por ozono depende de la via de administracion del agonista y no de la respuesta biologica en si misma, siendo la via intravenosa la que produce resultados mas reproducibles ya que 14 horas despues de la exposicion a ozono se observa hiperreactividad bronquial al agonista administrado intravenosamente de manera similar a la hiperreactividad inducida por inhalacion la cual desaparece 2 dias despues de la exposicion a ozono, mientras que la primera permanece.

Hay que considerar tres condiciones experimentales en la observación de la hiperreactividad a histamina inducida por crono in vivo: el daño mecánico de los nervios vagos, la estimulación noradrenérgica y el pretratamiento con atropina. La broncoconstricción inducida por la administración intravenosa de histamina refleja un incremento en el tono del músculo liso de las vías aéreas que resulta principalmente de una acción directa en los receptores H₁ y de un reflejo vagovagal evocado por la estimulación de los receptores de irritación subepiteliales, y es atenuada por los efectos broncodilatadores de adrenalina circulante. De hecho, la administración intravenosa de histamina potencia la liberación de catecolaminas (Macquibban et al., 1978). Holmoyde y Norris (1988) han reportado que la vagotomía indujo un aumento de la reactividad a histamina en los cobayos expuestos a crono. En cambio, Gordon et al., (1984) reportaron que la vagotomía no alteró significativamente la hiperreactividad a histamina en cobayos expuestos a crono aunque, debido a que la respuesta a histamina fue muy grande, dejan abierta la posibilidad de que la participación vagal en la respuesta a histamina este encubierta por otros efectos del crono en las vías aéreas. Aunque en el presente estudio los nervios vagos de todos los animales estudiados in vivo fueron dañados mecánicamente, no se analizó la influencia de la vagotomía en la hiperreactividad de las vías aéreas. Sin embargo, cabe especular que aunque se haya eliminado la participación del reflejo vagovagal, la vagotomía haya tenido poco o ningún efecto en la respuesta a histamina ya que esta, al igual que en los experimentos de Gordon et al. (1984), se incrementó considerablemente por efecto del crono ya que las dosis efectivas medias disminuyeron significativamente tanto en animales normales como sensibilizados.

De acuerdo con Gordon et al. (1984) el pretratamiento con atropina no altera la hiperreactividad a histamina en el

cobayo. Además debido al protocolo experimental de estos estudios, al momento de estudiar la reactividad a histamina habían transcurrido alrededor de dos horas desde la administración de la atropina.

En cuanto a la estimulación norcolinérgica, podría especularse que la liberación de taquicinas endógenas potenciará la respuesta a histamina puesto que han sido propuestas como neuromoduladores de la regulación periférica del músculo liso traqueobronquial (Faría et al., 1988). Las observaciones de este estudio no pueden descartar ni apoyar esta hipótesis; sin embargo, se ha señalado que la administración intravenosa de sustancia P a cobayos sensibilizados y no sensibilizados *in vivo* no afecta la respuesta broncoconstrictora inducida por alérgeno o carbocel (Schreiber et al., 1988).

A diferencia de las observaciones realizadas *in vivo*, el ozono no induce hiperreactividad a histamina en las tráqueas provenientes de cobayos normales o sensibilizados estudiadas *in vitro*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gordon et al. (1984) y Holbrook y Norris (1986) también en tráqueas aisladas de cobayos expuestos a ozono. Hay también datos convincentes de que la reactividad de las vías aéreas *in vivo* en humanos no se correlaciona con la respuesta *in vitro* del músculo liso de las vías aéreas obtenidos de los mismos sujetos (Armour et al., 1984; Taylor et al., 1985). Estas observaciones tienden a descartar que la hiperreactividad inducida por ozono se deba a alteraciones del músculo liso en sí mismo. Apoyan la participación de los mecanismos neurales reflejos y de los mediadores inflamatorios.

Contrariamente a las observaciones anteriores, Nurlas et al., (1979) han encontrado hiperreactividad a acetilcolina en tráqueas provenientes de cobayos con hiperreactividad bronquial *in vivo* inducida por 5 ppm de ozono durante 2 horas y estudiadas 30 minutos después de la exposición. Sin embargo, es posible que esta observación se deba a que los

tejidos fueron preincubados con indometacina, y por lo tanto, se halla inhibido la producción de PGE₂ la cual, como se ha mostrado recientemente, es una de las prostaglandinas liberadas en mayor cantidad por las células epiteliales de las vías aéreas y ejerce un poderoso efecto relajante en el músculo liso (Braunstein et al., 1982).

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS TRAQUEAS SIN EPIHELIO

El ozono no modifica la sensibilización a histamina de las traqueas con o sin epitelio provenientes de cobayos normales y sensibilizados. En estudios similares en perros y cobayos tampoco se han encontrado diferencias en la reactividad a acetilcolina de las traqueas sin epitelio provenientes de animales expuestos al aire o a ozono (Walters et al., 1982; Murias et al., 1980; Holmboe y Morris (1980). Al igual que en este estudio, no encontraron diferencias significativas en la respuesta a histamina de traqueas con o sin epitelio de cobayos expuestos a aire o a ozono. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la hiperreactividad a histamina observada *in vivo* no se debe a la pérdida de un factor epitelial relajante por efecto del ozono (Jones et al., 1983), y confirman que tampoco resulta de alteraciones del músculo liso de las vías aéreas en el mismo como también lo han sugerido Jones y col. (1983).

Es posible que el ozono cause daño funcional al epitelio menos severo que el producido por la remoción total del mismo. Esta hipótesis se ve apoyada por los estudios de Murias y Col. (1980) quienes han observado hiperreactividad a sustancia P en traqueas provenientes de cobayos expuestos a ozono y han propuesto que esto produce una disfunción epitelial al oxidar la endopeptidasa neutra del epitelio respiratorio. La mayoría de los estudios que han probado un papel del daño oxidativo en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono son morfológicos o bien han reportado aumento de la permeabilidad. La hipótesis de un daño

funcional del epitelio por oxidación de la endopeptidasa neutra y por lo tanto mayor concentración de taquicininas apoya la importancia de estos péptidos en la hiperreactividad bronquial inmediata inducida por ozono in vivo.

EFECTO DEL OZONO SOBRE EL RATO ANTIGENICO

La exposición a ozono a ozono produce hiperreactividad bronquial a ovalbúmina administrada por vía intravenosa a cobayos sensibilizados. Existen estudios con hallazgos opuestos en cuanto al efecto del ozono en la respuesta pulmonar al rato antigénico. En ovejas sensibilizadas a Oscaris la exposición a 1.5 ppm de ozono disminuyó la broncoconstricción inducida por el rato antigénico inhalado a las 2 horas y a las 24 horas después de la exposición (Abraham et al., 1963). En perros los estudios de vías aéreas periféricas mostraron que una exposición breve de 5 min a 1 ppm de ozono disminuyó la respuesta al rato antigénico local (Hiesberger et al., 1967). Ya que los neutrófilos no estaban presentes una hora cono al 24 horas después de la exposición de ozono, los autores concluyeron que la reducción en la respuesta fisiológica al antígeno fue independiente de la inflamación de las vías aéreas.

En contraposición, Nathanson ha reportado que los cobayos expuestos durante 30 min a 5 ppm de ozono presentaron mayor absorción y retención del antígeno en el pulmón (1970a) y que 5 ppm incrementaron significativamente el grado de ataques dispnéicos consecuentes al rato antigénico (1970b). Geibold et al. (1960) encontraron que el grado de sensibilización aumentó en ratones expuestos a ozono al estudiar la administración subsecuente de antígeno y observar el aumento bronquial. Los resultados del presente estudio coinciden con los de Geibold et al. (1960) en que la vía de administración del antígeno es intravenosa. Esto es relevante en relación al 2% de sitios estrictos del mecanismo responsable del incremento inducido por ozono en la reactividad bronquial al antígeno. Cuando la vía de

administración de inhalatoria se ha hipotetizado que la exposición a ozono podría alterar la respuesta al antígeno debido a que aumenta la permeabilidad epitelial (Matsunura, 1970a; Kozul et al., 1987) con un consecuente aumento del acceso del antígeno a las células cebadas subepiteliales, lo cual origina un incremento de la broncoconstricción alérgica. En este estudio la exposición a ozono indujo hiperreactividad al antígeno administrado intravenosamente lo cual sugiere que no es causada solamente por hiperpermeabilidad de la mucosa de las vías aéreas.

Deebols y col. (1979, 1981, 1985) han mostrado que el número de células que contienen IgE e IgG en el pulmón aumenta y se correlaciona positivamente con el aumento de la sensibilidad alérgica pulmonar de los ratones expuestos a concentraciones ambientales de ozono (0.17, 0.16, 0.21 ppm), lo que sugiere que la inhalación de ozono produce cambios en la reactividad inmunológica que podrían explicar el aumento de la respuesta al reto antigénico. Por otra parte, en cobayos se ha demostrado que el ozono induce aumento del número de células cebadas y disminución de las concentraciones plasmáticas de histamina (Murlan y Roum, 1985; Shields y Cold, 1987). En base a estos resultados se propone que el ozono afecta al quema y la función de las células cebadas pulmonares estimulando la liberación de histamina. En relación con estos estudios, recientemente Yanai y col. (1990) han reportado que el ozono incrementó los niveles de histamina plasmática después del reto antigénico con Aspergillus spores a cobayos. Los resultados de estos estudios sugieren que el ozono potencia la reacción alérgica en el pulmón, aunque este proceso puede bien explicarse por la respuesta inflamatoria inducida por ozono, ya que en el presente estudio, tras 15 horas de la exposición a ozono el número de neutrófilos y eosinófilos se mantuvo similar a los cobayos sensibilizados y la liberación de mediadores primarios de las células cebadas puede inducir la liberación de mediadores secundarios de

otras células independientes de la reacción con IgE, los cuales pueden a su vez amplificar o modular la reactividad de las vías aéreas a los mediadores primarios.

La relevancia clínica de estos estudios es si los humanos asmáticos pueden estar predispuestos o ser más susceptibles a la inhalación del antígeno por la exposición breve a ozono a las concentraciones encontradas en áreas urbanas. Al respecto, recientemente se ha mostrado que la exposición a 0.4 ppm de ozono durante 2 horas produce mayor obstrucción de las vías aéreas en sujetos asmáticos que en normales (Leibel et al., 1980).

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LAS CELULAS INFLAMATORIAS

Los resultados de estos estudios muestran que el ozono induce incrementos en el número de neutrófilos (cobayos normales) y eosinófilos (cobayos sensibilizados) en el fluido recuperado del lavaje broncoalveolar. Estos resultados sugieren que la hiperreactividad bronquial está asociada con una respuesta inflamatoria que involucra neutrófilos en los cobayos normales y neutrófilos y eosinófilos en los sensibilizados.

La exposición aguda a ozono induce una respuesta inflamatoria que se caracteriza por un influxo de leucocitos polimorfonucleares en el lumen de las vías aéreas de los cobayos normales. Los estudios en diferentes especies de mamíferos proveen datos contradictorios acerca del papel de los neutrófilos en la inducción de hiperreactividad causada por ozono, y se ha sugerido que estas diferencias se deben a la especie (Sheppard, 1982).

Los estudios realizados por el grupo de Holtzman y col. (1982a, 1983b; Feber et al., 1984) en perros sugieren una asociación cercana entre el aumento en la reactividad y el desarrollo de la inflamación en el epitelio de las vías aéreas. Estos investigadores sostienen que el curso temporal del desarrollo de la hiperreactividad y la inflamación son similares tanto en humanos como en perros expuestos a ozono y que la hiperreactividad inducida por ozono puede depender

de la movilización de neutrófilos en las vías aéreas. En humanos se ha mostrado una asociación entre la hiperreactividad inducida por ozono y el aumento del número de neutrófilos en el fluido del lavado broncoalveolar, y entre la exposición a ozono y el aumento de las concentraciones de PGE₂, PGE₂ y tromboxano B₂ (Seltzer et al., 1986). Estos hallazgos han sido corroborados recientemente por Cohen y col. (1987).

Ya que este estudio se realizó 16 horas después de la exposición a ozono, es difícil al mismo tiempo al que se observó la reactividad, el incremento de esta y los incrementos de neutrófilos y eosinófilos pueden considerarse fenómenos temporalmente relacionados. Sin embargo, la asociación temporal de ambos fenómenos en este y en los estudios anteriormente mencionados no prueba una relación causal. De hecho, estos datos son circunstanciales y no establecen necesariamente una relación causa-efecto entre las células inflamatorias y la disfunción de las vías aéreas. La inflamación y la hiperreactividad bronquial pueden representar respuestas independientes a eventos anteriores o a una secuencia de efectos. Murias y Roum (1985) han encontrado en cobayos que el número de neutrófilos de la mucosa de las vías aéreas no se incrementó significativamente 2 horas después de la exposición a ozono, cuando ya la hiperreactividad era significativa, es decir durante la fase temprana del daño de las vías aéreas inducido por ozono. Sin embargo, en la fase tardía, la infiltración neutrófila fue sustancial. De estos hallazgos concluyeron que la neutrofilia es una consecuencia más que una causa del daño y la hiperreactividad de las vías aéreas inducidos por ozono. Los resultados del presente estudio coinciden con los de Murias y Roum (1985) en cuanto a la infiltración neutrófila en la fase tardía de la respuesta de las vías aéreas al ozono, aun cuando ellos evaluaron el número de células en cortes histológicos y no en lavados broncoalveolares. Debido al diseño experimental, en este

estudio no se evaluó la respuesta temprana al ozono, es decir inmediatamente hasta 2 horas después de la exposición. Sin embargo, en apoyo a los hallazgos de Murlas y Roum, se ha reportado que en cobayos expuestos al humo de cigarrillo también se presenta hiperreactividad bronquial antes de la migración de neutrófilos al epitelio respiratorio (Hulbert et al., 1985), por lo que, de acuerdo con ambos estudios, la fase temprana de la respuesta de las vías aéreas al ozono no está relacionada con la respuesta inflamatoria.

El mecanismo preciso por el que la hiperreactividad bronquial y la inflamación están relacionadas se desconoce. Sin embargo, no hay que perder de vista que aun cuando los polimorfonucleares se consideran el marcador predominante de inflamación aguda, existe una variedad de mediadores de diferentes vías bioquímicas que también se asocian con la inflamación y el daño pulmonar como los derivados del ácido araquidónico.

Hasta la fecha, no se ha reportado el efecto del ozono en animales sensibilizados aunque sí en humanos asmáticos. El incremento en el número de neutrófilos inducido por el procedimiento de sensibilización en cobayos inmunizados sugiere que la infiltración de granulocitos está relacionada con la respuesta inflamatoria inducida por ozono en animales sensibilizados. La neutrofilia inducida por el proceso de sensibilización así como la eosinofilia tardía coinciden con lo observado en otros modelos de inflamación de las vías aéreas en cobayos (Dunn et al., 1985; Hutson et al., 1988). Ya que la infiltración neutrófila ya estaba presente en las vías aéreas de los cobayos sensibilizados al momento de exponerlos a ozono, este indujo un aumento en el número de neutrófilos aunque no significativo. Sin embargo, los neutrófilos, probablemente activados por efecto del ozono, pueden generar varios mediadores inflamatorios como prostaglandinas, leucotrienes, especies reactivas de oxígeno y factor activador de las plaquetas que es un potente factor quimiotáctico para eosinófilos in vivo (Wardlaw et al.,

1986) con la consiguiente infiltración eosinofílica que se observó en los animales sensibilizados y expuestos a ozono.

Aunque en este estudio el número de linfocitos no varió significativamente por efecto de la exposición a ozono y esto coincide con los resultados de investigaciones en cobayas, monjes y humanos (Fabrizi et al., 1984; Muelas y Ream, 1985; Salazar et al., 1986; Lieberberg et al., 1987), el papel de estas células en la hiperreactividad bronquial ha recibido poca atención pues se han descrito mecanismos por los que los linfocitos podrían influir en la reactividad del músculo liso de las vías aéreas. Los linfocitos T son capaces de liberar factores que pueden inducir la liberación de sustancias de células pegadas (Sedgwick et al., 1981); esta observación se ha correlacionado con la reactividad bronquial inespecífica en sujetos asmáticos (Allen et al., 1987). Además los linfocitos son fuente de histamina que pueden activar mastocitos y dar lugar al influxo de neutrófilos y eosinófilos (Scheiber et al., 1982). Por lo tanto los linfocitos pueden ser capaces de modular el número y actividad de las células inflamatorias en las vías aéreas que son relevantes en la patogénesis del asma (Muller et al., 1988).

Por otra parte, existen investigaciones que muestran interacciones significativas entre el ozono y los linfocitos. Células que se sitúan positivamente para inmunoglobulina se han identificado cerca de las vías aéreas (Deebold et al., 1977), mientras que los linfocitos que residen en los nodulos linfáticos mediastínicos son estimulados para proliferar (Drexler y White, 1982). Recientemente Eide et al. (1980) han mostrado que los linfocitos del tejido linfoide asociado con los bronquios y los nodulos linfáticos mediastínicos proliferan durante la exposición a 0.5 ppm de ozono durante 20 horas en ratas, indicando que la respuesta inflamatoria a ozono involucra linfocitos y toma lugar en múltiples sitios incluyendo los nodulos linfáticos. En base a estas consideraciones resulta

necesario dilucidar el papel de los linfocitos y las linfocinas tanto en la respuesta inflamatoria inducida por ozono como en la fisiopatología del asma.

En cuanto a los macrófagos existen diferentes investigaciones que, a diferencia de los resultados de este estudio, si encuentran variación en su número por efecto del ozono, aunque los hallazgos son contradictorios. En el fluido de lavado pulmonar de ratas expuestas a 1.2 ppm de ozono el número de macrófagos disminuyó significativamente inmediatamente después de la exposición a ozono y aumentó 3 días después de la exposición (Bassett et al., 1988). La exposición a ozono redujo el número de macrófagos alveolares significativamente tanto en cobayos como en conejos (Holroyde y Horne, 1988; Alpert et al., 1971). Sin embargo, en perros no se ha encontrado ningún cambio (Faber et al., 1984). Los macrófagos son abundantes a través de todas las vías respiratorias y pueden liberar mediadores inflamatorios como tromboxano, prostaglandinas y factor activador de las plaquetas (Barnes et al., 1988). Sin embargo, hasta ahora se desconoce como participan en la respuesta inflamatoria inducida por ozono.

La inflamación inducida por ozono en las vías aéreas altas y bajas se ha mostrado en varios estudios en animales y humanos. La posibilidad de que la inflamación se relacione con el desarrollo de la hiperreactividad bronquial ha sido objeto de investigación en los años recientes. De hecho, la inflamación de las vías aéreas puede crear condiciones que se han propuesto como mecanismos de hiperreactividad, como el edema bronquial, la hiperpermeabilidad epitelial, la reducción de terminales nerviosas sensoriales y la liberación de mediadores inflamatorios. Estos pueden influir en la reactividad a través de mecanismos neurales. Los reflejos autóctonos locales pueden sensibilizarse después del daño epitelial y la liberación local de mediadores inflamatorios como bradiquinina, con la consiguiente liberación de

neuropéptidos, como las taquicininas; esto podría potenciar el efecto de otras sustancias broncoconstrictoras.

MODELO HOLÍSTICO DEL EFECTO DEL OZONO EN LAS VIAS AERIAS

Debido a la complejidad de reacciones que pueden ocurrir subsecuentemente al daño celular inducido por ozono no se ha establecido claramente la patogenia de la hiperreactividad bronquial inducida por ozono. El ozono es considerado que son varios los factores que contribuyen a su generación.

Vistos en conjunto, los resultados de las diversas investigaciones sugieren que los pasos que van desde la exposición a un estímulo inflamatorio (el ozono) hasta el desarrollo de la hiperreactividad bronquial son oxidación de los lípidos y proteínas de las membranas celulares con la consiguiente activación y daño de las células epiteliales de la superficie de las vías aéreas. Esta oxidación puede hacer a los lípidos membranales más susceptibles a las fosfolipasas con la subsecuente generación de ácido araquidónico al cual es sensible a potentes factores quimiotácticos. El daño morfológico de las células epiteliales puede resultar en hiperpermeabilidad y en la exposición y estimulación de los receptores de irritación y de las fibras y ferretes. En estos procesos se localizan en o cerca del epitelio y pueden liberar neuropéptidos que a su vez activan otras células. Las células cebadas también pueden ser activadas por los mediadores inflamatorios producidos por las células epiteliales para liberar histamina. Los metabolitos del ácido araquidónico liberados de las células epiteliales y cebadas estimulan a los neutrófilos quimiotácticamente hacia el epitelio de las vías aéreas. Estos al activarse liberan a su vez prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que actúan sobre el músculo liso de las vías aéreas o sus nervios incrementando la reactividad. Todas estas células se deben contribuir a las respuestas observadas en varias especies de mamíferos.

*

R E F E R E N C I A S

- Abraham MM, Yergler L, Marchette B y Wanner A. The effect of ozone on antigen-induced bronchospasm in allergic sheep. In: Biomedical effects of ozone and related biochemical oxidants. Lee T, Mustafa H, Muhlman M (eds.). Princeton Scientific, Princeton NJ, pp.173-202, 1980.
- Adventer C, Kalline E, Draxson S, Requi D. Relative reactivity of neurokinins in guinea pig trachea and human bronchus. *Sur J Pharmacol* 10:177-187, 1987.
- Agencia Americana de Protección Ambiental. Air quality criteria for ozone and photochemical oxidants. EPA 600/8-79-004.
- Aizawa H, Chung KF, Leitner B, Ueki I, Sichel R, O'Byrne P, Hirose T, Nadel J. Significance of thromboxane generation in ozone-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *J Appl Physiol* 69:1818-1822, 1985.
- Alex S, Suno F, Rosnicki J, Lamminta E. The magnitude of the spontaneous production of histamine-releasing factor by lymphocytes in vitro correlates with the state of bronchial hyperreactivity in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 77:100-106, 1987.
- Albert S y Lewis T. Ozone tolerance studies utilizing unilateral lung exposure. *J Appl Physiol* 31:243-246, 1971.
- Albert SM, Gardner D, Junge B, Lewis T, Coffin D. Effects of exposure to ozone on defensive mechanisms of the lung. *J Appl Physiol* 31:247-250, 1971.
- Albert T, Schwartz E, Lee S y Lewis T. Alveolar protein accumulation. A sensitive indicator of low level oxidant toxicity. *Arch Intern Med* 133:18-22, 1981.
- Ander M, Ueno J y Underhill D. Respiratory response of guinea pigs to ozone alone and with sulfur dioxide. *Am Ind Hyg Assoc J* 19:982-981, 1978.
- Andersson RG y Grundstrom M. Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. *Pharmacol Ther* 30:107-170, 1987.
- Armour DL, Laska N, Schellenberg R, Taylor S, Crane N, Hogg J y Ford T. A comparison of in vivo and in vitro human airway reactivity to histamine. *Am Rev Respir Dis* 129:907-910, 1984.

Austen KF y Orange NF. Bronchial asthma: The possible role of the chemical mediators of immediate hypersensitivity in the pathogenesis of subacute chronic disease. *Amer Rev Respir Dis* 112:422-430, 1975.

Barnes PJ. Asthma as an acute reaction. *Lancet* 1:142-145, 1986.

Barnes PJ, Chung KF y Page C. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40:43-64, 1988.

Bartlett D, Franklin C, Teel J. Effect of chronic ozone exposure on lung elasticity in young rats. *J Appl Physiol* 37:92-96, 1974.

Bassett DL, Brown-Webb E, Zerkow E, Elson J, Robinson J, S. Buntin T y Kerr J. A reversible model of acute lung injury based on ozone exposure. *Lung* 104:355-367, 1986.

Bates DV y Sisto R. Relationship between air pollutant levels and hospital admissions in southern Ontario. *Can J Public Health* 74:117-122, 1983.

Beckett W, Robinson W, Morrison D y House D. Role of the parasympathetic nervous system in acute lung response to ozone. *J Appl Physiol* 59:1277-1285, 1985.

Black J, Johnson P y Archer C. Potentiation of the contractile effects of neuropeptides in human bronchus by an endothelium inhibitor. *Toxic Pharmacol* 1:21-23, 1988.

Bochner B, Gaco D, Fink B. Acute Effects of ozone on rat lungs. II. Structural. *Am Rev Resp Dis* 110:157-168, 1974.

Boorman S, Schwartz L y Bungard D. Pulmonary effects of prolonged ozone inhalation in rats: Morphometric evaluation of the control animal. *Lab Invest* 60:1055-1062, 1986.

Borson DE, Corrales P, Versano S, Gold M, Vira Y y Cavney E. Endothelinase inhibitors potentiate substance P-induced release of ^{45}Ca and nucleotides from ferret trachea. *Exp Lung Res* 12:21-30, 1987.

Boushey H, Holtzman M, Shelton J y Kadel J. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Resp Dis* 121:337-417, 1980.

Braunstein G, Lebar J, Brambilla S, Benveniste J, Marsac J y Erion D. Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea-pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E_2 production. *Br J Pharmacol* 95:300-308, 1985.

Bravo H, Ferrin F, Sosa R y Torres R. Incremento de la contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la ciudad de México. Ingeniería Ambiental 1:8-14, 40, 1988.

Brinkman R, Lambert H y Vaninga T. Radiometric toxicity of ozonized air. Lancet 1:122-125, 1964.

Cadle R y Allen G. Atmospheric photochemistry. Science 167:242-249, 1970.

Carroll R, Jessurun J, Laurel J, Brennan S, Owen M, Vaughan L y Boswell D. Structure and variation of human α -antitrypsin. Nature 228:122-124, 1971.

Castleman W, Dunworth D y Tyler W. Cytotochemically detected alterations of lung acid phosphatase reactivity following ozone exposure. Lab Invest 29:210-219, 1973.

Castleman W, Tyler W y Dunworth D. Lesions in respiratory bronchioles and conducting airways of guinea pigs exposed to ambient levels of ozone. Exp Mol Pathol 10:104-109, 1977.

Castleman W, Dunworth D, Edwards L y Tyler W. 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, 1970.

Chern RF y Torata T. Evidence for nonadrenergic inhibitory nerve in the guinea pig trachealis muscle. Am J Physiol 224:1072-1080, 1972.

Coffe MJ, Yano R, Gross A, Torata T y Eschenbacher W. Inoculation does not inhibit the ozone-induced increases in bronchial responsiveness in human subjects. Am Rev Resp Dis 111:870, 1975.

Coffin D, Gardner D, Holzman R y Holick F. Influence of ozone on pulmonary cells. Arch Environ Health 10:621-626, 1960.

Coleman EG. Evidence for non adrenergic inhibitory nervous pathway in guinea pig trachea. Br J Pharmac 48:350-361P, 1972.

Costa DL, Scharfink GN, Wanner R, Collett G. Alveolar permeability to protein in rats differentially susceptible to ozone. J Appl Toxicol 5:182-186, 1985.

Gross C, DeLuca A, Reddy A, Gussain H, Chow S, Mustafa M. Ozone interaction with lung tissue: Biochemical approaches. Am J Med 60:927-934, 1976.

Chow CK. Influence of dietary vitamin E on susceptibility to ozone exposure. In: Biomedical effects of ozone and photochemical oxidants. Lab S. Mustafa M y Hahlman M (eds.). Princeton Scientific, Princeton, NJ, pp.75-83, 1983.

Chow CK y Tappel AL. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids* 7:518-524, 1972.

Chow CK y Tappel AL. Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. *Arch Environ Health* 33:205-208, 1973.

Chow CK, Dillard C y Tappel AL. Glutathione peroxidase system and lysosomes in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ Res* 7:311-317, 1974.

Chow CK, Blesper C, Chiu M y Duncworth D. Dietary vitamin E and pulmonary biochemical and morphological alterations of rats exposed to 3.1 ppm ozone. *Environ Res* 34:315-324, 1981.

Davis JB, Galis J, Ho SA, Poucher R y Bronberg R. The effects of ozone on respiratory epithelial permeability. *Am Rev Respir Dis* 111:201, 1970.

Davis C, Langan M, Jones T y Daniel EE. Control of human airway smooth muscle: in vitro studies. *J Appl Physiol* 53:1089-1097, 1982.

DeLucia AJ, Rogan C, Mustafa M y Cross C. Ozone interaction with rodent lung: effect on sulfhydryls and sulfhydryl-containing enzyme activities. *J Lab Clin Med* 80:557-562, 1972.

DeLucia AJ, Mustafa M, Hussain N y Cross C. Ozone interaction with rodent lung: Evidence of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. *J Clin Invest* 53:799-802, 1973.

Dillard C, Venkataru N, Reddy N, Fletcher B, Taylor S, de Lumen B, Langberg S y Tappel A. Increased lysosomal enzymes in lungs of ozone-exposed rats. *Arch Environ Health* 35:428-431, 1972.

Dimes RJ, Glenn H, Holtzman MJ, Shaller J, Hacci J y Boushey H. Threshold concentration of ozone causing an increase in bronchial reactivity in humans and adaptation with repeated exposures. *Am Rev Respir Dis* 124:245-246, 1981.

Donovan DH, Williams S, Charles J y Henschel O. Ozone toxicity: Effect of dietary vitamin E and polyunsaturated fatty acids. *Toxicol Lett* 14:177-187, 1973.

Dunworth D, Castleman W, Chew C, Mallick P, Mustafa M, Tarkington P, Tyler W. Effects of ambient levels of ozone on monkeys. Fed Proc 34:1670-1674, 1975.

Dunn CJ, Elliott G, Costeveau J, Richards I. Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. Am Rev Resp Dis 177:541-547, 1958.

Dusser DJ, Driebe T, Gordon D, Madel A. Cigarette smoke induces a tracheoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivated airway neutral endopeptidase in the guinea pig. J Clin Invest 64:702-708, 1979.

Dziedziec D, White M. Thymus and pulmonary lymph node responses to acute and subchronic ozone inhalation in the mouse. Environ Res 31:378-385, 1982.

Dziedziec D, Wright T, Gargano M. Pulmonary response to ozone: Reaction of bronchus-associated lymphoid tissue and lymph node lymphocytes in the rat. Environ Res 51:184-208, 1980.

Easton RE, Murray JD. Experimental ozone bronchospasm and histamine. Arch Environ Health 15:160-161, 1957.

Elsayed AM, Mustafa M, Fostelshuit E. Age-dependent pulmonary response of rats to ozone exposure. J Toxicol Environ Health 9:825-842, 1982.

Empey DW, Leitchman L, Jacobs L, Gold W, Madel J. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after respiratory tract infections. Am Rev Respir Dis 113:131-139, 1976.

Eustis SL, Edwards L, Gold W, Dunaway G. Chronic bronchialitis in nonhuman primates after prolonged ozone exposure. Am J Pathol 103:121-127, 1971.

Evans MJ, Johnson L, Stephens E, Freeman C. Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of ozone. Exp Mol Pathol 24:70-81, 1976.

Fabiani LM, Ariana W, Alford G, Walters E, D'Ermo P, Gold B, Madel J, Spittman M. Airway hyperresponsiveness and changes in cell counts in bronchoalveolar lavage after ozone exposure in dogs. Am Rev Respir Dis 110:288-291, 1984.

Farrall SP, Kerr H, Kulle T, Sauder L, Young J. Adaptation in human subjects to the effects of inhaled ozone after repeated exposures. Am Rev Respir Dis 119:725-730, 1979.

Finney MJ, Karlsson J y Persson CG. Effects of bronchoconstrictors and bronchodilators on a novel small airway preparation. *Br J Pharmac* 83:29-33, 1985.

Fish JE, Rosenthal R, Batts G, Menkes H, Sumner W, Permutt S y Norman P. Airway responses to methacholine in allergic and nonallergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 112:579-586, 1976.

Flavahan NA, Gannals L, Rimels T y Vanhoutte P. Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J Appl Physiol* 55:874-880, 1983.

Fletcher S y Fabbel A. Protective effects of dietary alpha-tocopherol in rats exposed to toxic levels of ozone and nitrogen dioxide. *Environ Res* 21:166-175, 1977.

Folinsbee LJ, Silverman F, Sheppard R. Exercise responses following ozone exposure. *J Appl Physiol* 38:906-1001, 1975.

Folinsbee LJ, Eadi J y Kershath S. Respiratory responses in humans repeatedly exposed to low concentrations of ozone. *Am Rev Respir Dis* 101:701-707, 1970.

Folinsbee LJ, Hordstam D, Kowal H, Garrity T, Abdul-Salaam S, Kohn M, Seal E, Hinds M y Ives R. Pulmonary function and airway responsiveness after repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am Rev Respir Dis* 141:671, 1970.

Fouts JM, DeLomon G y McFladden E. Airway response to ultra short-term exposure to ozone. *Am Rev Respir Dis* 107:325-330, 1973.

Freeman BA y Madd JB. Reaction of ozone with sulfhydryls of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 208:212-220, 1981.

Fressard N. Regulation mechanisms of the contractile responses of rat airways to immunological stimulation. *Clin Exp Allergy* 17:1001-1008, 1987.

Gardner DE, Lewis T, Siebert S, Hirst D y Corrie D. The role of tolerance in pulmonary defense mechanisms. *Arch Environ Health* 22:472-488, 1972.

Gershwin LJ, Gicelle JW y Lee Y. Immunoglobulin E-containing cells in mouse lung following allergen inhalation and ozone exposure. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 65:266-277, 1981.

Gertner A, Bronsberger-Eknes S, Dannenberg A, Traystman R y Menkes H. Responses of the lung periphery to 1.0 ppm ozone. *J Appl Physiol* 55:770-775, 1983.

Giri SN, Hollinger N, y Schiedt M. The effects of ozone and paraquat on PEF₅₀ levels in plasma and combined pleural effusion and lung lavage of rats. Environ Res 11:467-478, 1980.

Gliner JA, Horvath T, y Folinsbee LJ. Exposure to low ozone concentrations does not diminish the pulmonary function response to exposure to higher ozone concentrations. Am Rev Respir Dis 117:51-55, 1978.

Goel V, y Borge DF. Comparison of the bronchoconstrictor and cardiovascular effects of ozone tachykinins in guinea pigs. Life Sci 34:1017-1018, 1984.

Golden JF, Nadel J, y Batane H. Essential hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. Am Rev Respir Dis 110:227-229, 1974.

Goldstein RD. Ozone: exposure to ozone and nitrogen dioxide. Environ Health Perspect 34:127-89, 1979.

Goldstein RD, Solomon S, Haverkamp E, y Dickers D. Decrease in rabbit lung macrophage interferon P-250 levels following ozone exposure. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 10:759-762, 1975.

Gordon T, Taylor E, y Amour D. Ozone inhibition of tissue cholinesterase in guinea pigs. Arch Environ Health 34:254-259, 1981.

Gordon T, Venugobalan D, Amour W, y Dragan J. Ozone-induced airway hyperreactivity in the guinea pig. J Appl Physiol 57:1034-1038, 1984.

Grane D, Henderson F, y House D. Neutrophil influx measured in nasal lavage of humans exposed to ozone. Arch Environ Health 37:229-233, 1980.

Grundstein N, Anderson T, y Willard J. Pharmacological characterization of the autonomic innervation of the guinea pig tracheobronchial smooth muscle. Acta Pharmacol Tox 45:120-127, 1981.

Hadley J, Linn W, Garcia C, Buckle R, Low D, Bates D, Mazucha M, Fennelly L, y Silverman F. Effects of ozone exposure in Denodides and Southern California: Evidence for adaptation. Arch Environ Health 32:110-112, 1977.

Harkins J, Plappner C, Hyde D, George J, Wilson D, y Bungworth D. Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. Am J Pathol 126:27-44, 1987.

Hay DWF, Muccitelli R, Horstemeier D, Wilson H, Fabbri D. Demonstration of the release of an epithelium-derived inhibitory factor from a novel preparation of guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 135:247-259, 1987.

Hazona MJ, Basso D, Bromberg P. Mechanism of action of ozone on the human lung. *J Appl Physiol* 47:1235-1241, 1979.

Holroyde ND, Morris A. The effect of ozone on reactivity of upper and lower airways in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 94:932-942, 1985.

Holtzman AG, Cunningham J, Shaller J, Instaler G, Nadel J, Boushey H. Effect of ozone on bronchial reactivity in atopic and nonatopic subjects. *Am Rev Respir Dis* 120:1057-1067, 1979.

Holtzman AG, Fabbri L, O'Syane P, Gold B, Aizawa H, Walters E, Albert S, Nadel J. Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am Rev Respir Dis* 127:162-170, 1983.

Holtzman AG, Fabbri L, Shephard E, O'Syane P, Walters E, Aizawa H, Nadel J. Time course of airway hyperresponsiveness induced by ozone in dogs. *J Appl Physiol* 55:1232-1236, 1982.

Hornath S, Singer J, Folinsbee L. Adaptation to ozone: Duration and effect. *Am Rev Respir Dis* 121:426-430, 1981.

Hu FC, Mills F, Daniels N, Hater G, Granas J, Gardner D, Selgrade H. Protein accumulation in lung lavage fluid following ozone exposure. *Inviron Tox* 37:177-189, 1982.

Hud AF, Lundberg J, Timpone-Jones H, Fabbri D. Comparison of cardiorespiratory and bronchoconstrictor effects of substance P, acetylcholine and tachykinins. *Naunyn-Schroederberg Arch Pharmacol* 102:172-181, 1984.

Hulbert WM, Malcom T, Hogg J. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 122:7-11, 1985.

Hudson RA, Church H, Day T, Miller F, Holgate S. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 107:648-657, 1982.

Ibrahim AL, Lee Y, Ouebois J. The effects of ozone on the respiratory epithelium of mice. II. Ultrastructural alterations. *J Environ Pathol Toxicol* 3:251-258, 1980.

Inoue M, Sato E, Hirose T, Kikuchi Y, Utsukata T, Nagashima S, Sasaki T, & Takishima T. A comparative study between functional and pathologic alterations in lungs of rabbits exposed to an ambient level of ozone: Functional aspects. *Nihyo Shokai-shi* 17:108-123, 1977.

Johnson DA. Ozone inactivation of human α -1-proteinase inhibitor. *Am Rev Respir Dis* 101:1001-1003, 1970.

Jones GL, Lane C, Manning P, & O'Byrne P. Role of the parasympathetic nervous system in airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *J Appl Physiol* 67:1174-1179, 1987.

Jones GL, O'Byrne P, Pashley M, Seric R, Jury J, Lane C, & Daniel EE. Airway smooth muscle responsiveness from dogs with airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *J Appl Physiol* 65:27-34, 1982.

Jones GL, Lane C, Daniel EE, & O'Byrne P. Release of epithel-derived release factor after ozone inhalation in dogs. *J Appl Physiol* 63:1238-1243, 1982.

Joss SF, Pauwels R, Van Der Straeten M. The role of neuropeptides as neurotransmitters of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in bronchial asthma. *Bull Eur Physiother Respir* 23:617-627, 1983.

Karlsson JA, & Persson CG. Evidence against vasoactive intestinal polypeptide as a dilator and in favour of substance P as a constrictor in airway neurogenic response. *Br J Pharmacol* 77:804-808, 1983.

Karlsson JA, Finnley M, Persson CG, & Post C. Substance P antagonists and the role of tachykinins in non-cholinergic bronchoconstriction. *Life Sci* 15:2681-2691, 1984.

Kawet RI, & Braun J. Reaction of the lung to air pollutant exposure. *Life Sci* 15:2687-2691, 1976.

Kehel M, Vincent L, Nowakowy R, Worsman D, O'Neil J, McCarty M, & Broberg P. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am Rev Respir Dis* 105:1124-1128, 1987.

Kelly DA, Stanton B, Ward C, Bird S, Hendrick B, & Walters E. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid obtained from stable asthmatics and their correlation with bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy* 19:169-175, 1987.

Kleiberger I, Kolbe J, Adkinson F, Peters S, & Spannake E. The role of mediators in the response of the canine peripheral lung to a low ozone. *Am Rev Respir Dis* 117:221-225, 1988.

- Kleeberger G, Kolbe J, Turner C y Spannake C. Exposure to 1 ppm ozone attenuates the immediate antigenic response of canine peripheral airways. *J Toxicol Environ Health* 20:349-362, 1986.
- Kohan N, Devlin R, Goshaw D, Mann R, McCee H, Horstman D, Kozumbo W, Leaker S, House E, McDonnell W y Bromberg P. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am Rev Respir Dis* 109:407-410, 1989.
- Kreit JW, Grossi M, Moore T, Lenzman T, D'Arcy J y Eschenbacher W. Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J Appl Physiol* 66:217-222, 1989.
- Kulic T, Parr H, Farrell S, Snader L, Szwed M y Smith D. Adaptation to ozone on pulmonary function and bronchial reactivity in guinea subjects. *Am Rev Respir Dis* 100:127, 1981.
- Laitinen LA. Histamine and methacholine challenges in the testing of bronchial reactivity. *Scand J Respir Dis Suppl* 96:1-47, 1974.
- Lee H y Muriau C. Ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs is abolished by 20 PPM or 75 PPM 85%12 but not by indomethacin. *Am Rev Respir Dis* 122:1005-1009, 1985.
- Lee LY, Klewster B, Nadel J. Effect of ozone on the bronchomotor response to inhaled histamine aerosol in dogs. *J Appl Physiol* 43:226-231-1978.
- Lee LY, Duncan C, D'Amico T, Mangel T y Nadel J. Mechanism of rapid shallow breathing after ozone exposure in conscious dog. *J Appl Physiol* 44:1103-1114, 1978.
- Lewis F y Austen K. Mediators of local homeostasis and inflammation. E. Leukotrienes and other mast cell dependent compounds. *Nature* 291:103-108, 1981.
- Lundberg JM y Sario A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of desensitization-sensitive vagal sensory neurons. *Comp Physiol* 115:477-479, 1980.
- Lundberg JM y Sario A. Capsaicin induced desensitization of the airway smooth to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature* 290:251-257, 1982.
- Lundberg JM, Sario A. Polypeptide-containing neurons in airway sensory afferents. *Ann Rev Physiol* 49:557-572, 1987.
- Lundberg JM, Martling C, Sario A, Follans A y Rowell S. Cigarette smoke-induced airway oedema due to activation of

capsaicin-sensitive vagal afferentes and substance P release. *Neuroscience* 10:1331-1338, 1983.

Macquin-Mavier I, Clerici C, Franco-Montoya M y Harf A. Induced epinephrine release in guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 247:704-708, 1988.

Martins DR, Theodorsson-Nordhög G y Lundberg JM Occurrence and effects of multiple tachykinin: substance P, neurokinin B y neuropeptide Y, in human lower airways. *Life Sci* 40:1633-1643, 1987.

Matsumura Y. The effects of ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide on the experimentally induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. II The effects of ozone on the absorption and the retention of antigen in the lung. *Am Rev Resp Dis* 102:433-447, 1970a.

Matsumura Y. The effects of ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide on the experimentally induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. III The effect on the occurrence of dyspneic attacks. *Am Rev Resp Dis* 102:444-447, 1970b.

McCord JM y Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Int Med* 87:122-127, 1977.

McDonnell W, Borchert D, Dublin G, Abdul-Salam S, Ives P y O'Neil J. Biochemical and cellular correlates of changes in pulmonary function and chemistry in human exposed to ozone. *Am Rev Resp Dis* 111:472, 1975.

Mehlman MA y Borel O. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ Res* 41:54-59, 1987.

Mellish FN, Dungey-Davies DL, Schwartz L y Taylor W. Short-term morphologic effects of high ambient levels of ozone on lungs of rhesus monkeys. *Lab Invest* 31:32-39, 1977.

Menzel DE. Toxicity of ozone, oxygen and radiation. *Ann Rev Pharmacol* 10:379-399, 1970.

Menzel DE. Oxidation of biologically active reducing substances by ozone. *Arch Environ Health* 28:143-150, 1971.

Menzel DE. Ozone: An overview of its toxicity in man and animals. *J Toxicol Environ Health* 13:131-204, 1984.

Menzel DE, Anderson W y Abou-Donta M. Ozone exposure modifies prostaglandin biosynthesis in perfused rat lungs. *Adv Suppl Clin Toxicol Pharmacol* 15:175-187, 1978.

Miller P., Ainsworth D., Lam H y Amdur M. Effect of ozone exposure on lung functions and plasma prostaglandin and thromboxane concentrations in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 88:122-140, 1983.

Mizumi J., Escher E., DiGiuseppe-Juste F y Regoli D. Undecar- and octa-peptide antagonists for substance P: a study on the guinea pig trachea. *Eur J Pharmacol* 97: 193-200, 1984.

Montano LH, Salzman H, Fonda-Montes H y Vargas M. Role of airway epithelium on the reactivity of smooth muscle from guinea pigs sensitized to ovalbumin by inhalatory method. *Res Exp Med* 150:162-170, 1986.

Montano LH, Vargas M, Vargas B y Salzman H. Bronchoconstriction induced by parasympathetic stimulation in cobayas: influence of the neurotransmitters acetylcholine and colinérgicos. *Rev Inst Mal End Resp Mex* 2:15-22, 1989.

Moore FF y Schwartz LW. Neurobiological effects of prolonged exposure to ozone and sulfuric acid aerosol in the rat lung. *Exp Mol Pathol* 33:126-133, 1981.

Mudd JB, Lovitt R, Ingham A y Harland T. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ* 13:627-631, 1979.

Mudd JB y Freeman BR. Reaction of ozone with biological membranes. En: *Biochemical effects of environmental pollutants*. Vol 8R (ed. J. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp. 57-173, 1977.

Murias C y Lee RH. U-50,487 inhibits ozone-induced bronchial hyperreactivity in the guinea pig. *Prostaglandins* 36:563-570, 1988.

Murias C y Fain M. Sequence of pathologic changes in the airway mucus of guinea pig during ozone-induced bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 131:514-520, 1985.

Murias C, Murphy T y Chabalillo-Villaseca. Ozone-induced mucosa-linked airway muscle hyperresponsiveness in the guinea pig. *J Appl Physiol* 62:1747, 1987.

Mustafa HG y Lee ED. Pulmonary biochemical alterations resulting from ozone exposure. *Am Occup Hyg* 12:17-26, 1976.

Mustafa HG y Tierney DF. Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am Rev Respir Dis* 110:1081-1090, 1975.

Mustafa MS, DeLuca A, York C, Arth D y Cross C. Ozone interaction with mouse lung. II. Effects of oxygen consumption of mitochondria. *J Lab Clin Med* 92:357-365, 1973.

Mustafa MS, Elsayed H, Graham J y Gardner D. Effects of ozone exposure on lung metabolism. Influence of animal age, species, and exposure conditions. In: Biochemical effects of ozone and photochemical oxidants. Lee S, Mustafa MS y Nalband H (eds). Franchising Scientific, Princeton, NJ, pp.57-70, 1980.

Nadel JA. Autonomic regulation of the airways. *Ann Rev Med* 35:451-467, 1984.

Nambu F, Imai T, Nishimi M, Takahashi. Effect of DMV-048 on airway hyperresponsiveness induced by ozone in dogs. *Relia Pharmacol Japan* 99:271-277, 1990.

Nicola H, Wilson D, Sims S, Flopper C y Dunworth D. The response of the rat bronchial epithelium to ozone exposure. *Am J Pathol* 121:777-804, 1993.

O Byrne PM, Walters E, Gold S, Arava H, Fabbri L, Albert S, Nadel J y Holzman MJ. Neutrophil activation inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure. *Am Rev Respir Dis* 130:214-219, 1994.

O'Byrne PM, Walters E, Arava H, Fabbri L, Holzman MJ y Nadel J. Indomethacin inhibits the airway hyperresponsiveness but not the neutrophil influx induced by ozone in dogs. *Am Rev Respir Dis* 130:220-224, 1994.

O'Byrne PM y Fuller RW. The role of thromboxane A₂ in the pathogenesis of airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 7:752-756, 1994.

Organization Mundial de la Salud. Photochemical oxidants: Environmental health criteria 7. OMS, Ginebra, 1979.

Osebold MW, Jones E, Lee Y, Gordon W, LaBarre D. Immunological alterations in the lungs of mice following ozone exposure: Changes in immunoglobulin levels and antibody-containing cells. *Arch Environ Health* 34:258-265, 1978.

Osebold J, Lee Y y Garabito LJ. Enhancement of allergic lung sensitization in mice by ozone inhalation. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:259-264, 1988.

Palmer MS, Swanson D y Coffin B. Effect of ozone on benzopyrene hydroxylase activity in the Syrian golden hamster. *Cancer Res* 31:730-733, 1971.

Milbauer DC, Dunbarworth D, Tyler K, Chan G. Pulmonary alterations in rats exposed to 0.2 and 0.1 ppm ozone: A comparative morphological and biochemical study. Arch Environ Health 34:330-335, 1978.

Fryer WA. Free radical reactions in biology: Initiation of lipid autoxidation by ozone and nitrogen dioxide. Environ Health Perspect 44:109-131, 1979.

Fryer WA, Doolley J, Church G. Mechanisms for the reaction of ozone with biological molecules, the source of the toxic effects of ozone. In: Biomedical effects of ozone and photochemical air pollution. Lee S, Wessely H, Guelman M, eds. Princeton Scientific, Princeton NJ, pp.7-17, 1980.

Reason MD, Adams S, Brooks J, Rubin R. Enrichment of albumin and IgG in the airway secretions of dogs breathing ozone. J Environ Sci Health 17:323-326, 1979.

Reich D, Erspass S, Dion S, D'Orleans-Juste F. Pharmacological operators for substance P and neurokinins. Life Sci 26:109-117, 1980.

Rehm J, Madley J, Menzel BS. Anticarcinogens versus lung disease. Proc Intern Med 107:30-33, 1971.

Roun JB, Murias C. Ozone-induced changes in muscarinic bronchial reactivity, by different testing methods. J Appl Physiol 57:1700-1705, 1984.

Said SI. Environmental injury of the lung: Role of humoral mediators. Fed Proc 37:2504-2507, 1978.

Sato S, Shimura E, Hirota T, Nanda E, Kawasumi M, Takishima T, Hara H. Effects of long-term ozone exposure and dietary vitamin E in rats. J Exp Med 160:117-125, 1980.

Schreiber J, Becker P, Blantz J, Nieder K, Jenne P. Influence of substance P on the bronchial reactivity of sensitized and nonsensitized guinea pigs in vivo. Biomed Biophys Acta 47:81-84, 1983.

Schrieder JM, Kasper BS. Anatomy of the nasopharyngeal airway of experimental animals. Anat Rec 200:103-105, 1981.

Schwartz LW, Dunbarworth D, Mustafa M, Tarlingston B, Tyler W. Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone: Effects of tidal inspirations on pulmonary exposure. Lab Invest 34:525-530, 1974.

Scribner SD, Page JL, Russell S, Atman A, Katz DH. Macrophage activating factor produced by a T cell hybridoma: physicochemical and biosynthetic resemblance to gamma interferon. J Immunol 131:625-632, 1983.

- Sedgwick J, Klein P y Turner H. Production of a high-molecular-weight lymphokine by antigen or mitogen stimulated human peripheral T cells. *Clin Exp Immunol* 45:407-416, 1981.
- Sekizawa K, Tanuchi J, Goto F, Seebach C, Gordon D y Nadel J. Endoneurial inhibitor potentiates mammalian tachykinin-induced contraction in ferret bronchi. *J Pharmacol Exp Ther* 240:1211-1217, 1987.
- Seltzer J, Sigby G, Sulzberg M, Holtzman MP, Nadel J, Ueno I, Lefkowitz G, Goral E y Soshaev N. Ozone-induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J Appl Physiol* 60:1221-1224, 1984.
- Sheppard D. Mechanisms of acute increases in airway responsiveness caused by environmental chemicals. *J Allergy Clin Immunol* 81:122-132, 1988.
- Sniesko RL y Gold WM. Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious awake dogs. *Environ Res* 42:135-145, 1987.
- Shane E, Stular-Gerard M, Coast S y Deaneh J. Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. Enhancement by inhibitors of neutral metalloprotease and angiotensin-converting enzyme. *Am Rev Respir Dis* 137:231-236, 1988.
- Sielczak M, Deane S y Abraham W. Airway cell changes in tracheal lavage of sheep after ozone exposure. *J Toxicol Environ Health* 11:345-352, 1983.
- Sligter A, Englebret G, Jonsson A y Ersson E. Hydrolysis of substance P and neurokinin B by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:769-774, 1984.
- Stephens RJ, Abraham W, Stone J. y Corrin D. Cytologic changes in dog lungs induced by chronic exposure to ozone. *Am J Pathol* 70:111-120, 1972.
- Stephens RJ, Clark M, Evans K y Pradhan S. Alveolar type I cell response to exposure to 0.5 ppm ozone for short periods. *Exp Mol Pathol* 20:11-20, 1974.
- Stular-Gerard M. Neutral endopeptidase like enzyme controls the contractile activity of substance P in guinea pig lung. *J Clin Invest* 77:1019-1025, 1987.
- Tallarida RJ y Murray RS. Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Springer-Verlag, Nueva York, 1981.

Tanaka IT y Brunstein Mh. Mechanisms of substance P-induced contraction of rabbit's airway smooth muscle. J Appl Physiol 57:1353-1357, 1984.

Taylor SM, Fale P, Armour G, Hogg J y Schellenberg R. Airway reactivity in chronic obstructive pulmonary disease. Failure of in vitro methacholine responsiveness to correlate with cholinergic, adrenergic or non-adrenergic responses in vitro. Am Rev Respir Dis 122:33-38, 1980.

Tepper JB, Datta E, Lemann J, Koser M y Hatch G. Unaltered structural and biochemical alterations in the rat lung during functional adaptation to ozone. Am Rev Respir Dis 120:975-981, 1979.

Thompson JE y Sheppard D. Phosphoramidon potentiates the increase in lung resistance mediated by tachykinins in guinea pigs. Am Rev Respir Dis 127:1227-1240, 1983.

Thompson JE, Seyidzadeh L, Gordon T y Sheppard D. Tachykinins mediate the acute increase in airway resistance caused by aerosolized histamine in guinea pigs. Am Rev Respir Dis 124:15-20, 1981.

Vargas MH, Naranjo LH, Ponce I y Delano M. An inhalatory method using ovalbumin and Streptococcus pneumoniae for inducing allergic bronchospasm in guinea pigs. Mod Res Res 15:179-184, 1967.

Wallenstein S, Zucker C, Fluder J. Some statistical methods useful in circulation research. Circ Res 47:157, 1980.

Walters D, D'Souza P, Graf F, Fester L y Kadel J. The responsiveness of airway smooth muscle in vitro from dogs with allergic hyperresponsiveness in vivo. Clin Sci Lond 71:605-611, 1981.

Wardlaw G, Nadel J, Ironwell G, Ray PE. Platelet-activating factor: a potent bronchoconstrictor and bronchomotor factor for eosinophils. J Clin Invest 70:1701-1706, 1982.

Waterbale S, Frank R y Johnson R. Acute effects of ozone on lungs of rats. I. Functional. Am Rev Respir Dis 100:1141-1151, 1970.

Wagner CD, Jackson A, Berry J y Gillespie J. The effects of long-term low level ozone exposure on static, dynamic and oscillatory pulmonary mechanics in monkeys. Am Rev Respir Dis 128:81-87, 1981.

Williams S, Charles J y Mendel DB. Ozone induced alterations in phenol red absorption from the rat lung. Toxicol Lett 4:317-319, 1980.

Yanai N, Ohrai T, Aikawa T, Okuyama H, Sekizawa M, Maeyama K, Sasakai H y Takishima T. Ozone increases susceptibility to antigen inhalation in allergic dogs. J Appl Physiol 68:2247-2252, 1990.

Zwerman B, Glavin R, Fauberg J, Falliers C y Aaron T. Effects of air pollution on asthma: a review. J Allergy Clin Immunol 50:305-324, 1972.