

720378



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

201

**DESARROLLO DE SISTEMAS "IN VITRO" QUE PERMITAN
VALORAR CITOTOXICIDAD DE PARTICULAS
CONTAMINANTES (POLVO)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

ADRIANA GUADALUPE YAÑEZ BURUEL

MEXICO, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

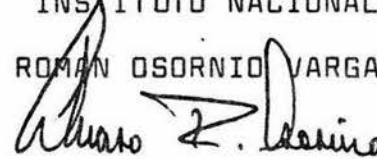
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO. según el tema:

PRESIDENTE	Prof: ENRIQUE CALDERON GARCIA.
VOCAL	Prof: ALVARO ROMAN OSORNIO VARGAS
SECRETARIO	Prof: RAUL GARZA VELASCO
1er. SUPLENTE	Prof: JOSE MANUEL PEREZ CERVANTES
2do. SUPLENTE	Prof: ALBA P. NEGRETE MUÑOZ

Sitio donde se desarrolló el Tema: INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

Nombre y firma del asesor: ALVARO ROMAN OSORNIO VARGAS.



Nombre y firma del sustentante: ADRIANA GUADALUPE YAÑEZ BURUEL.



A mi padre: JOSE LUIS.

Por ser Arquitecto
de mi felicidad y confianza,
por permitirme ser, una pequeña parte,
de sus grandes obras.

A la memoria de mi madre: VIRGEN.

He procurado conservar intacto tu recuerdo
aunque no se que tan intacto está,
sin ti.

Con todo mi amor.

A mis hermanos: TODOS

Yo no se que les debo,
pero eso que no se,
se que es muchísimo.

A TI:

Con cariño.

Dr. Alvaro Osornio Vargas.

Por darme confianza,

y su invaluable amistad.

Q.F.B. Raúl Garza Velasco.

Por su valiosa aportación

en el mejoramiento de esta tesis.

Dra. Beatriz Medina.

Por su gran ayuda

en la realización de este trabajo.

Al Depto. de Patología del I.N.C.I.Ch.

Al Depto. de Bioquímica del I.N.C.I.Ch.

Un agradecimiento muy especial,
a la Srita. Teresa Hermenegildo,
por su gran ayuda en la realización
de este escrito. Con cariño y
amistad.

INDICE

INTRODUCCION	1
DESARROLLO EXPERIMENTAL	10
Obtención y separación del Polvo de Mexicali (PM).	10
Sistemas "in vitro"	11
1. Determinación de Actividad Hemolítica	11
1.1 Actividad Hemolítica de PM (10 μm) a concentraciones altas de eritrocitos (1.2%) y de polvo.	11
1.2 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) a concentraciones altas de polvo y muy baja concentración de eritrocitos (0.08%).	13
1.3 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) y controles a baja concentración de eritrocitos (0.6%) y de polvos.	14
1.4 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) y controles, a bajas concentraciones de eritrocitos (0.6%), ajustando el número de partículas por ml de suspensión.	14
2. Incubación de Macrófagos con Polvos Inorgánicos.	17
2.1 Estudio Comparativo del PM con Polvo Inerte.	17
2.2 Estudio Comparativo del PM con un Control Positivo y un Polvo Inerte.	21

3. Análisis Microbiológico.	23
3.1 Cultivo	23
3.2 Aislamiento.	23
3.3 Observación.	24
RESULTADOS	25
Obtención y separación del PM	25
Sistemas "in vitro"	27
1. Determinación de Actividad Hemolítica	27
1.1 Actividad Hemolítica de PM (10 μ m) a concentraciones altas de eritrocitos (1.2%). y de polvo	27
1.2 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μ m) a concentraciones altas de polvo y muy baja concentración de eritrocitos.(0.08%).	31
1.3 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μ m) y controles a baja concentración de eritrocitos (0.6%) y de polvos.	31
1.4 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μ m) y controles, a bajas concentraciones de eritrocitos (0.6%), ajustando el número de partículas por ml de suspensión.	33
2. Incubación de Macrófagos con Polvos Inorgánicos.	38

2.1 Estudio Comparativo del PM con Polvo Inerte.	38
2.2 Estudio Comparativo del PM con un Control Positivo y un Polvo Inerte.	43
3. Análisis Microbiológico.	46
DISCUSION.	48
CONCLUSIONES.	58
BIBLIOGRAFIA.	60

INTRODUCCION.

Es poco el conocimiento que se tiene sobre los efectos tóxicos de los polvos - inorgánicos ambientales a los que estamos expuestos y se sabe aún menos, sobre el mecanismo por el cual algunos de éstos causan daño celular y, por tanto, en fermedad.

La mayoría de los datos existentes sobre contaminantes, se refieren a polvos - orgánicos (bagazo de caña, fibras de algodón), gases (óxidos de azufre, monóxidos de carbono), partículas inorgánicas (asbestos, sílice, silicatos no asbestos) y metales (cobalto, cadmio, plomo), los cuales causan daño al ser inhalados (1,2).

Algunos de estos contaminantes actúan como alergenos, otros como cancerígenos- y algunos otros son responsables del desarrollo de bronquitis, enfisema y pneumoconiosis (3). Esta última es una afección de los pulmones originada por la inhalación de polvos que, al ser atrapados por ellos, pueden provocar reacciones inflamatorias (4). Aunque este padecimiento se considera una enfermedad - ocupacional (5), pudiera llegar a constituir un grave problema no ocupacional- en caso de existir altas concentraciones de partículas inorgánicas en el ambiente.

Exceptuando a los gases, poco se sabe acerca de la manera en la que algunos de

estos contaminantes actúan sobre los seres vivos y especialmente sobre el aparato respiratorio, por ser éste el que se expone inicialmente a la contaminación atmosférica.

Son muchos los estudios desarrollados en el extranjero sobre los efectos nocivos de una gran variedad de partículas, tales como micas (6), polvo de San --- Diego, California (7), arena del Desierto del Sahara (8), algunas variedades de silicatos (5,9,10), etc, pero es poco lo que se ha estudiado acerca de su mecanismo tóxico. Estos estudios comprenden datos epidemiológicos, hallazgos histológicos y estudios experimentales "in vivo" e "in vitro". En éstos, básicamente se consideran dos hipótesis sobre los efectos de partículas inorgánicas.

Una de ellas establece que las características fisico-químicas de las partículas son las principales responsables de su capacidad para inducir daño celular (11,12,13,14) y, la segunda, además de considerar estas propiedades supone un daño en el que participa de manera "inespecífica" el sistema inmune (15).

En esta última, las reacciones inmunológicas se asocian a un efecto estimulador del polvo hacia los macrófagos, posiblemente análogos a las endotoxinas bacterianas, que se traduce en liberación de inmunoestimuladores y sustancias fibrogénicas por estas células fagocitarias.

En estos estudios, es clara la relación que existe entre la toxicidad y las --

propiedades fisico-químicas de cada partícula: carga neta, forma y tamaño, ya que las comprendidas entre 0.1 y 5 μm , son retenidas en el pulmón.

Por otro lado, resulta de notoria importancia, la relación que existe entre la dosis inhalada y los efectos originados.

Además de todo lo anterior, los efectos son dependientes de muchos otros factores que los hacen diferentes en cada ciudad y país del mundo, entre ellos destacan: clima, erosión, altura, etc. (1).

En México, se cuenta con poca información que nos mantenga al tanto de nuestra situación y resulta más grave aún el hecho de que desconocemos nuestro grado de exposición a partículas tóxicas, en un ambiente en que su concentración aumenta día a día.

De aquí la importancia de valorar los efectos nocivos de polvos inorgánicos. Generalmente, estas investigaciones inician con estudios poco complejos en sistemas "in vitro" que proporcionan una idea de lo que ocurre a las células aisladas. Normalmente, estos se emplean para estandarizar condiciones y dosis adecuadas que pueden servir como punto de partida para efectuar estudios "in vivo" y la combinación de ambos, permiten llegar a un conocimiento más detallado sobre la relación causa-efecto de estos polvos.

En una gran variedad de estudios se han usado modelos experimentales "in vivo" para valorar estas partículas tóxicas; en general, se han llevado a cabo en -

animales de laboratorio en los cuales se puede observar las reacciones tisulares correspondientes y relacionarlas con las dosis en que han sido inhaladas o instiladas (16). Entre los sistemas "in vitro", se cuentan aquellos que valoran el potencial tóxico de los polvos y fibras al ser aplicados sobre la membrana de eritrocitos humanos, por ser éstos fácilmente obtenidos y porque los efectos inducidos por polvos pueden ser observados y cuantificados de manera clara y casi inmediata (17,18,19,20,21,22).

Un ejemplo claro de esto lo constituyen estudios realizados con cuarzo y asbesto crisotilo, en los que se encontró una alta capacidad hemolítica. En el caso del asbesto, se cree que su citotoxicidad es debida a las cargas de su superficie (carga impartida por Mg^{2+}) (19), las cuales permiten su unión con las cargas negativas de los residuos de ácido siálico que se encuentran en la superficie de la membrana de los eritrocitos; posteriormente, dicha unión provoca la redistribución de proteínas en la membrana y altera su permeabilidad con un imbalance en el flujo de Na^+ y K^+ entre el citoplasma y el medio. Dando lugar finalmente, a la citólisis. Paralelos a éstos, se han realizado otros estudios en los que la hemólisis es inhibida por adición de suero o N-óxido-2---polovinilpiridina; estas sustancias actúan cubriendo la superficie de los polvos y fibras, evitando así, en mayor o menor grado, su contacto con la superficie celular. Otra manera de evitar la hemólisis es degradando con neuramini

dasa la cubierta celular de ácido siálico (12,13,19).

El conocimiento de los mecanismos referidos, conduce a un mejor entendimiento de las alteraciones que ocurren en células aisladas. Sin embargo, no es posible asegurar que el polvo altamente hemolítico induzca daño en otras células o en la superficie pulmonar y que, por el contrario, las partículas con bajo potencial hemolítico no puedan causarlo.

Estos antecedentes han motivado al desarrollo de otros sistemas "in vitro", en el que se pueden incubar polvos inorgánicos con las células que están directamente relacionadas con el daño producido tras la inhalación de polvos. El sistema en cuestión incluye a macrófagos alveolares, dado que estas células son las principales responsables de la "esterilidad" normal del pulmón y de la protección del tracto respiratorio contra una gran variedad de materiales extraños (incluyendo a los polvos) (23,24); los efectos de éstos sobre los macrófagos, generalmente son observados por la liberación de enzimas al medio: cuando la membrana celular ha sido dañada existe liberación de enzimas citoplásmicas (Deshidrogenasa Láctica DHL). Las enzimas lisosomales (proteasas, ribonucleasa ácida, β -glucuronidasa, fosfatasa ácida, lisosima, β -galactosidasa y fosfolipasas) se excretarán poco después, en caso de que los lisosomas hayan sido dañados (25,26,27,28).

Sobre los mecanismos de daño a macrófagos, se conocen varias hipótesis pero a-

la fecha, ninguna de ellas ha podido ser confirmada (29,30).

Es un hecho que los efectos tóxicos reproducidos en sistemas "in vitro", (en los que se incuban células con polvos inorgánicos) aportan una idea más real sobre el potencial patógeno de éstos.

En el año de 1983, se presentó en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez", un caso de Neumonitis Interticial en una paciente de Mexicali, Baja--California Norte, en cuya biopsia pulmonar se encontró engrosamiento de los tabiques alveolares por la presencia de fibrosis y una inflamación crónica gra--nulosomatosa; en el seno de los granulomas se encontraron polvos inorgánicos bi--rrefringentes que, por Microanálisis de Rayos X* (31,32), se detectó que correspondían a partículas de Aluminio y Silicio, en una relación de 1:3. Con el --objeto de identificar la fuente de exposición a estos polvos y tratar de establecer su papel en el desarrollo de la enfermedad de esta paciente, se colectó el polvo acumulado en la casa de ésta: el microanálisis de este polvo dio re--sultados idénticos a los obtenidos en la biopsia. Este hallazgo nos obligó a explorar la posible relación causa-efecto del Polvo de Mexicali (PM) y la en--fermedad intersticial pulmonar; por este motivo, se procedió a analizar el po--tencial tóxico de este polvo.

La Difracción de Rayos X** (31), demostró la existencia de una mezcla de fel--

despatos (silicato de aluminio), cuarzo (dióxido de silicio) y calcita (carbonato de calcio).

El análisis individual de partículas por Microanálisis de Rayos X*, demostró - que el 83% de éstas tenían Aluminio, Silicio y Potasio (relación de Al:Si 1:3) 3% eran partículas de Silicio únicamente, 3% de partículas de Calcio y, el resto, diversas combinaciones (33). Esta situación motivó que, en nuestro laboratorio, se establecieron técnicas "in vitro" encaminadas a valorar la toxicidad de los polvos, comparándolos con otros de potencial tóxico conocido (19).

Para esto, fue necesario contar, primeramente con partículas de PM cuyo tamaño promedio fuera de $\leq 5 \mu\text{m}$, semejantes a las que al ser inhaladas son retenidas - por el pulmón.

Una vez aisladas en cantidad suficiente, fueron desarrollados los sistemas que valoraron su capacidad hemolítica y sus efectos sobre macrófagos. En ambos estudios, se variaron las concentraciones de polvo y el tiempo de incubación, -- con el fin de establecer la cantidad mínima requerida de polvo para observar - efectos tóxicos y, a la vez, determinar el tiempo en que ésto ocurre.

Finalmente, se realizó un análisis microbiológico microscópico del PM, con el - objeto de conocer los microorganismos presentes en estas muestras y establecer - su posible participación en el desarrollo de la enfermedad. La secuencia y variables manejadas en los diferentes experimentos de esta tesis, se resumen a - continuación:

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Obtención y separación del PM.

Sistemas "in vitro".

1. Determinación de la Actividad Hemolítica del PM.

Variables:

Polvo		Eritrocitos	Ajuste del No. de Partículas	
Tamaño	Concentración	Concentración		
10 μm	Altas (0.5-10mg/ml)	1.2%	no	(1.1)
3.2 μm	Altas	0.08%	no	(1.2)
3.2 μm	Bajas (0.1-2.0mg/ml)	0.6%	no	(1.3)
3.2 μm	Bajas	0.6%	si	(1.4)

Constantes: Tiempo de incubación: 1 hr y Temperatura: 37^oC.

Medio: PBS.

2. Incubación de Macrófagos con Polvos Inorgánicos.

Variables:

Ratas	Alícuotas	Polvos - Concentración	No. células	Ajuste (1×10^6 cél)
1	4	PM Fe carb. 0.3 mg/ml	aprox. 500,000	si (2.1)
2	1/4	PM Cuarzo L-103 0.3 mg/ml	1'000,000	no (2.2)

Constantes: Tiempos de incubación: 0, 1 y 2 hrs.

Temperatura 37°C , PM = $3.2 \mu\text{m}$

Medio PBS.

Estos sistemas "in vitro" no sólo sirven como indicadores del potencial tóxico del PM, sino que además, establecen una metodología aplicable a otros polvos - con posibles efectos tóxicos, presentes en cualquier parte del país. Estos estudios constituyen el principio de un proyecto de investigación sobre Efectos de Polvos Inorgánicos que se realiza en el Depto. de Patología del I.N.C.I.Ch.

* Dr. Alvaro R. Osornio Vargas, Depto. Patología, I.N.C.I.Ch.

** QFB. Angeles Alvarez. Div. Estudios Superiores, Fac. Química, U.N.A.M.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Obtención y separación del PM.

- Polvo de Mexicali (PM). Para la obtención de este polvo, se solicitó a la paciente que colectara (barriendo y sacudiendo) el polvo acumulado en su casa. Posteriormente, las muestras se almacenaron en frascos lavados, no estériles.

El polvo total fue tamizado por mallas de diferentes calibres (16, 30, 50, 100, 200, 325 mesh) llegando a una malla de 400 mesh. La porción final se suspendió en agua bidestilada (1 mg/ml) y se dejó sedimentar durante 5 min y se secó en estufa. Tanto la fracción de polvo obtenido de este sobrenadante como la correspondiente al polvo que atravesó la malla de 400 mesh, fueron montadas en discos de carbón y cubiertas con oro (Ion Sputter JFC---4100), para ser observados al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) --- (Jeol JSM-35C). Estas muestras fueron fotografiadas en el MEB con el fin de calcular su área y diámetro promedio por planimetría (Apple II-Plus).

- Polvos Control. Se utilizaron como polvos positivos: cuarzo y asbesto crisotilo y, como polvo negativo, Fe carbonilo; todos ellos fueron donados por el Dr. Arnold R. Brody, Laboratory of Pulmonary Function and Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, Triangle Park, NC.

Asimismo, como polvo control-problema, se utilizó polvo del laboratorio 103 (L-103). Todos estos polvos control fueron montados para MEB y se les determinó su diámetro promedio de la misma manera que para PM. A todos se les hizo Microanálisis de Rayos X*, para conocer su composición. Previo a los estudios "in vitro", todos los polvos recibieron un tratamiento con ultrasonido (Ultrasonic T-7) a frecuencia constante, durante 5 min, con el fin de homogeneizar la suspensión de partículas.

Sistemas "in vitro".

1. Determinación de Actividad Hemolítica.

1.1 Actividad Hemolítica de PM (10 μ m) a concentraciones altas de eritrocitos (1.2%) y de polvo.

- Eritrocitos. Se colectaron aproximadamente 5 ml de sangre venosa humana en un tubo heparinizado. Los eritrocitos fueron lavados varias veces con solución salina 0.9% amortiguada con fosfatos 0.15M pH= 7.35 (PBS) y, finalmente, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min eliminando sobrenadante. A continuación, se preparó una suspensión de eritrocitos al 3% en PBS.
- PM. Este polvo fue usado en cantidades crecientes de 5, 10, 20, 30, 50, 75 y 100 mg suspendidas en 6 ml de PBS y, 5 min antes de preparar las -

mezclas, se trató con ultrasonido.

- Mezclas problema. A cada una de las suspensiones de PM se agregaron -- 4 ml de la suspensión de eritrocitos al 3% para tener concentraciones - finales de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5 y 10.0 mg/ml. Las mezclas fue- ron incubadas a 37^oC con agitación moderada durante 1 hr (Blue M, baño- a temperatura constante).

- Controles de Hemólisis.

a) Control de fragilidad globular (blanco). Este se preparó con 4 ml-- de la suspensión de eritrocitos al 3% y 6 ml de PBS, obteniéndose, - igual que para los casos anteriores que los glóbulos rojos quedarán- al 1.2%.

b) Control de hemólisis total. A 4 ml de la suspensión de eritrocitos- se les centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrena-- dante y, a los glóbulos rojos obtenidos, se les adicionaron 10 ml de agua destilada para lisarlos completamente.

Ambos controles fueron incubados bajo las mismas condiciones y some- tidos al mismo procesamiento que las muestras del PM.

Una vez terminada la incubación, las suspensiones se centrifugaron a 1500- rpm durante 10 min y los sobrenadantes se analizaron espectrofotométrica-- mente (Pye Unicam SP 30 UV) a 540 nm en celdas de cuarzo, para determinar-

la cantidad de hemoglobina libre; el cero de densidad óptica (D.O) se ajustó con el control de fragilidad globular (blanco).

El grado de hemólisis fue expresado como porcentaje del total (control de hemólisis total).

$$\% \text{Hemólisis} = \frac{\text{D.O mezcla problema}}{\text{D.O hemólisis total}} \times 100$$

1.2 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) a concentraciones altas de polvo y muy baja de eritrocitos (0.08%).

- Eritrocitos. Fueron obtenidos y tratados por el mismo procedimiento,-- llegando finalmente a una suspensión de eritrocitos al 0.2%.
- PM.. Se usaron concentraciones de 5, 10, 20, 30, 50, 75 y 100 mg de PM de 3.2 μm , suspendidas en 6 ml de PBS y tratadas con ultrasonido 5 min-- previos a la mezcla.
- Mezclas problema. A cada una de las suspensiones de PM se les agregaron 4 ml de la suspensión de eritrocitos al 0.2%, con ello, se obtuvieron -- concentraciones finales de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5 y 10.0 mg de -- polvo/ml, mientras que los eritrocitos quedaron al 0.08%. Estas mez-- clas fueron incubadas a 37^oC con agitación moderada durante 1 hr.
- Controles. Se efectuaron de igual manera a los preparados para el estu-- dio antes mencionado.

Al término de la incubación, el tratamiento, lectura y reporte de resultado se llevaron a cabo de igual manera que para el estudio anterior.

1.3 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) y controles a baja concentración de -- eritrocitos (0.6%) y de polvos.

- Eritrocitos. Se colectaron y lavaron de la misma manera que para los estudios anteriores. Del paquete final de eritrocitos se preparó una suspensión al 1.5% en PBS.

- Polvos Control y Problema. Se emplearon concentraciones crecientes de 1, 3, 5, 10, 15 y 20 mg de todos los polvos, suspendidas en 6 ml de PBS y se trataron con ultrasonido durante los 5 min previos a la mezcla. Como controles positivos se usaron cuarzo y asbesto crisotilo, como negativo Fe carbonilo y, como problemas, PM y polvo L-103.

A partir de aquí, la mezcla, incubación y lectura, así como los controles de hemólisis fueron hechos de la misma manera que en los casos anteriores. El reporte de los resultados se expresa como porcentaje del total de hemoglobina libre (control de hemólisis total).

1.4 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) y controles, a bajas concentraciones de eritrocitos (0.6%), ajustando el número de partículas por ml de suspensión.

- Ajuste del número de partículas.

- a) Cuarzo (referencia y control positivo). Una suspensión preparada -- con 1 mg de cuarzo en 10 ml de agua bidestilada fue tratada con ul-- trasonido durante 5 min. De ésta fueron tomados 3 ml a los que se -- les agregó 7 ml de agua y de la suspensión final, se tomaron 2.5 ml-- (0.075 mg de cuarzo), que fueron filtrados en nucleopore y montados-- para MEB.
- b) PM (problema). Una suspensión de 1 mg de PM en 10 ml de agua bides-- tilada, fue tratada con ultrasonido durante 5 min. De esta suspen-- sión fueron tomados 2.8 ml y aforados a 10 ml con agua bidestilada. De esta segunda suspensión, se tomaron 3 ml y fueron llevados tam--- bién a 10 ml finales con agua. De esta suspensión final se tomaron-- 2.5 ml (0.021 mg de PM) y fueron filtrados en nucleopore y montados-- para MEB.
- c) Fe carbonilo (control negativo). Una suspensión de 1.05 mg de Fe -- carbonilo suspendidos en 10 ml de agua bidestilada, fueron tratados-- con ultrasonido durante 5 min. De esta suspensión, fueron tomados -- 3 ml y se trataron de la misma manera que para el cuarzo, obteniéndo se finalmente una concentración de Fe de 0.079 mg, que también fue-- ron filtrados y montados para MEB.

Estos tres filtrados fueron observados por MEB efectuándose el correspondiente recuento de las partículas en 30 campos en cada caso, siempre al mismo aumento: 10 000X. Del promedio de partículas por campo, se calculó la cantidad de partículas presentes en 1 mg de cada polvo y se estableció la equivalencia entre todos, tomando como referencia el número de partículas que hay en 1 mg de cuarzo.

- Eritrocitos. Obtenidos y tratados igual que en los casos anteriores, finalmente se realizó una suspensión de eritrocitos al 1.2% en PBS.
- Polvos Control y Problema. Fueron usadas concentraciones crecientes de polvo, de acuerdo al ajuste por número de partículas, tomando como referencia el cuarzo.

Cuarzo: 79×10^6 partículas/ml (1 mg/ml), 158×10^6 partículas/ml --
(2 mg/ml) y 237×10^6 partículas/ml (3 mg/ml).

PM: 79×10^6 partículas/ml (0.23 mg/ml), 158×10^6 partículas/ml --
(0.46 mg/ml) y 247×10^6 partículas/ml (0.69 mg/ml).

Fe carbonilo: 79×10^6 partículas/ml (1.11 mg/ml), 158×10^6 partícu---
las/ml (2.23 mg/ml) y 237×10^6 partículas/ml (3.34 mg/ml).

Se prepararon suspensiones de polvo en 3.5 ml de PBS a las concentraciones antes mencionadas y se trataron con ultrasonido durante los 5 min previos a la mezcla.

- Mezclas. A cada una de las suspensiones se les agregaron 3.5 ml de la suspensión de eritrocitos al 1.2%, quedando finalmente concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 mg de cuarzo por ml de suspensión total y cantidades de -- 39.5, 79 y 118.5 ($\times 10^6$) partículas/ml de todos los polvos y 0.6% de -- eritrocitos.

Los controles, la incubación y la lectura del sobrenadante se realizaron mediante los mismos procedimientos que en los casos anteriores. El reporte de los resultados se presentó como porcentaje del total de la hemólisis, en relación al número de partículas incubadas.

2. Incubación de Macrófagos con Polvos Inorgánicos.

- Animales. En todos los casos fueron utilizadas ratas macho Wistar de -- 200 a 300 gr, sin enfermedad pulmonar evidente, obtenidas del bioterio -- del I.N.C.I.Ch.

2.1 Estudio comparativo del PM con Polvo Inerte.

- Lavado Pulmonar. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intra-- peritoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) y se les expuso la tráquea. A ésta se le hizo una pequeña incisión y se le introdujo y aseguró una -- cánula del no. 15, unida a su vez a una jeringa colocada a 10 cm por encima del tórax del animal.

Los pulmones fueron perfundidos por gravedad con 10 ml de PBS a 37°C y el fluido celular fue colectado en un tubo de centrifuga a 10 cm por debajo del tórax de la rata. Este procedimiento fue repetido 4 veces por cada animal, usándose un animal por estudio. Con ello, se obtienen aproximadamente 2 millones de células por rata.

- Polvos. Fueron usadas concentraciones de 0.3 mg/ml tanto del PM como de Fe carbonilo usado como control negativo.
- Mezcla. Previo a la mezcla, de cada tubo del lavado pulmonar se tomaron una gota para cuenta diferencial y 0.1 ml para medir viabilidad celular por exclusión con azul tripán.

$$\frac{\# \text{ de células teñidas}}{\# \text{ de células totales}} \times 100$$

Para esta medición se agregaron 0.1 ml de azul tripán (0.5% en PBS) a 0.1 ml del lavado pulmonar. De esta mezcla se tomó una alícuota para llenar la cámara de Neubauer y las células se contaron en los mismos espacios utilizados para el conteo de glóbulos blancos.

$$\# \text{ células/ml} = \frac{\# \text{ células}}{4} \times 2 \times 10 \times 10^3 \quad \text{donde:}$$

4 : número de cuadros contados.

2 : dilución 1:2

10 : distancia en la cámara

10^3 : transformación mm^3 a ml.

El resto de cada tubo fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en un ml de PBS, obteniéndose finalmente 4 tubos: a1) incubación a tiempo 0; a2) (ver control); a3) incubación a una hora y a4) incubación a - 2 hrs. A cada uno de estos tubos, incluyendo al a2, se les adicionaron 0.3 mg/ml del polvo correspondiente.

- Controles:

a) Liberación total de enzima (a2). Esta alícuota actuó como control de liberación total de enzima, por destrucción total celular, pues la suspensión de células con polvo fue tratada con ultrasonido por un período de 30 min posteriores a su incubación por 1 hr.

b) Liberación espontánea de enzima. De otro lavado pulmonar colectado de la misma manera y bajo las mismas condiciones a las anteriores, se tuvieron otras 4 alícuotas, las cuales se incubaron por 0, 1 y 2 hrs sin agregarles polvo.

Tanto las mezclas como los controles, fueron incubados a 37°C durante sus

respectivos tiempos. Transcurridos éstos, 0.1 ml de la mezcla fue usado para medir viabilidad celular por exclusión con azul tripán y, el resto,--- se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado pa ra medir espectrofotométricamente la actividad enzimática por liberación de Deshidrogenasa Láctica (DHL), con equipos comerciales (Merck).

Esta prueba se hizo a 37°C, añadiendo 3 ml del sustrato (piruvato sódico-- 0.6 mM amortiguado con fosfatos 50 mM a pH igual 7.5) al vial que contiene ácido nicotín adenín dinucleótido (NADH 0.18 mM) y, a esta mezcla, se le añadieron 0.1 ml del sobrenadante obtenido de la incubación de cada tubo.- Esta mezcla se pasó enseguida a una cubeta de cuarzo para medir su extinción (NAD) a 340 nm y temperatura constante al cabo de 1 min. La lectura se repitió de minuto en minuto, durante 3 min para calcular la diferencial de extinción (AE/min) por minuto y obtener por ciento y unidades por -- litro (U/L) de acuerdo a la tabla que acompaña el equipo comercial.

Los resultados fueron expresados como porcentaje del total de enzima liberada en a2. para cada caso, corrigiendo por número de células (ajustando a 1 millón).

$$\% \text{ de enzima liberada} = \frac{\text{enzima liberada en a}^{\text{"X"}}}{\text{enzima liberada en a}^2} \times 100$$

Se calculó la correlación entre por ciento viable y por ciento de libera--

ción de DHL .

2.2 Estudio comparativo del PM con un Control Positivo y un Polvo Inerte.

- Lavado pulmonar. Bajo el mismo procedimiento anterior, los pulmones de rata fueron perfundidos con 10 ml de PBS y el fluído celular se colectó en un tubo de centrifuga de 6 ml siliconizado (Sigmacote) a 10 cm por debajo del tórax del animal. Este procedimiento fue repetido seis veces para cada rata, colectándose el fluído en el mismo tubo. Se usaron dos ratas por estudio colectándose, entre ambas, 4 millones de células aproximadamente.
- Polvos. Fueron usadas concentraciones de 0.3 mg/ml de PM y controles positivo, cuarzo y negativo, polvo L-103.
- Mezcla. Previo a la mezcla, el lavado pulmonar de ambas ratas fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 2 ml de PBS. Ambas suspensiones celulares fueron mezcladas en un solo tubo. De éste, fueron tomadas unas gotas para cuenta diferencial y 0.1 ml para medir viabilidad celular total.

La suspensión celular restante, fue distribuída en 4 tubos siliconizados en cantidades iguales, obteniéndose 4 alícuotas a las que se les adicionaron 0.3 mg/ml del polvo correspondiente. Las mezclas fueron tra

tadas e incubadas de igual forma que en el estudio anterior excepto a2- (ver control).

- Control:

- a) Liberación total de enzima (a2). A esta alícuota, además de la mezcla de polvo y células, se le agregaron 2 μ l de Tritón X100 (0.2%) - (detergente) y se le incubó por un período de 1 hr.
- b) Liberación espontánea de enzima (sin polvo). Se colectó otro lavado pulmonar por el mismo procedimiento al ya descrito, y fue tratado, - distribuido e incubado de igual forma, pero las alícuotas no fueron mezcladas con polvo.

Al término de la incubación, cada una de las mezclas y control fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante fue usado para medir espectrofotométricamente actividad enzimática por liberación de DHL. - Los resultados se presentan como porcentaje de la liberación total en a2 - para cada caso.

En este último estudio, no se hizo corrección por número de células pues - estaban en cantidades equivalentes en cada alícuota.

Cada uno de los estudios "in vitro", Actividad Hemolítica e Incubación de Macrófagos, tanto de PM como de los controles se desarrollan individualmente y - por triplicado. Los resultados se reportan como promedios \pm Error Estandar --

($\bar{x} \pm EE$) y la evaluación de significado estadístico se hizo con la prueba de "t" con un valor de $p < 0.05$ (34).

3. Análisis Microbiológico.

3.1 Cultivo:

3.1.1 Siembra de 10 mg de PM en caldo BHI (Infusión Cerebro-Corazón).

Bajo condiciones de esterilidad se añadieron 10 mg de PM a 2 ml de medio BHI, el cual se incubó a 37°C por un período de 24-48 hrs.

3.2 Aislamiento:

3.2.1 Siembra en Gelosa Sangre y en Hinton Muller.

Del cultivo de microorganismos en BHI, se sembraron por estría cruzada los medios de Gelosa Sangre y Hinton Muller y, posteriormente se incubaron a 37°C durante 24-48 hrs.

3.2.2 Siembra en medio 110.

Del cultivo de microorganismos en BHI, se sembró por estría cruzada el medio 110 y se incubó a 37°C durante 24 hrs y, una vez transcurridas estas, se sometió a una segunda incubación, a temperatura ambiente, con el objeto de que se produjera el pigmento de S. aureus, en caso de que este estuviera presente.

3.3 Observación:

Se realizaron frotis de las diferentes colonias presentes en todos los me
dios antes mencionados, se tiñeron mediante la técnica de Gram y se observaron
bajo el microscopio de luz con el objetivo de inmersión.

Los resultados reportados sólo incluyen el género de los microorganismos pre--
sentes y la determinación está basada tanto en las propiedades microscópicas -
como en las macroscópicas.

RESULTADOS.

Obtención y separación del PM.

El polvo enviado por la paciente contenía trozos de papel y madera, además de partículas de todos tamaños. Estas quedaron separadas al través de su paso -- por las mallas. El análisis gravimétrico dió el siguiente porcentaje (en peso) de partículas retenidas en cada malla: en la malla 30: 26.4%, malla 100: 25.1% malla 200: 36%, malla 325: 10.3%, y malla 400:0.2%.

Las partículas que atravesaron esta última, constituyen un 2% en peso del to-- tal y por observaciones al MEB y planimetría, encontramos que tenían un tamaño promedio de 10 μm . De esta fracción fueron separadas las partículas más pe--- queñas por sedimentación en agua bidestilada y, aplicando los métodos antes -- mencionados se encontró que tenían un tamaño promedio de 3.2 μm , según se muestra en la gráfica de distribución de frecuencias de la Fig. 1.

Esta determinación se realizó para cada uno de los polvos control utilizados, -- así como en el polvo L-103, encontrando que el cuarzo tiene un tamaño promedio de 2.6 μm , el Fe carbonilo de 1.6 μm y el polvo L-103 un tamaño promedio de -- 4.2 μm .

Al secar el PM, después de ser tratado por sedimentación en agua, las partícu-- las tienden a permanecer unidas en forma de acúmulos, por lo que fue necesario

POLVO DE MEXICALI SEDIMENTADO EN AGUA
DISTRIBUCION POR TAMAÑOS.

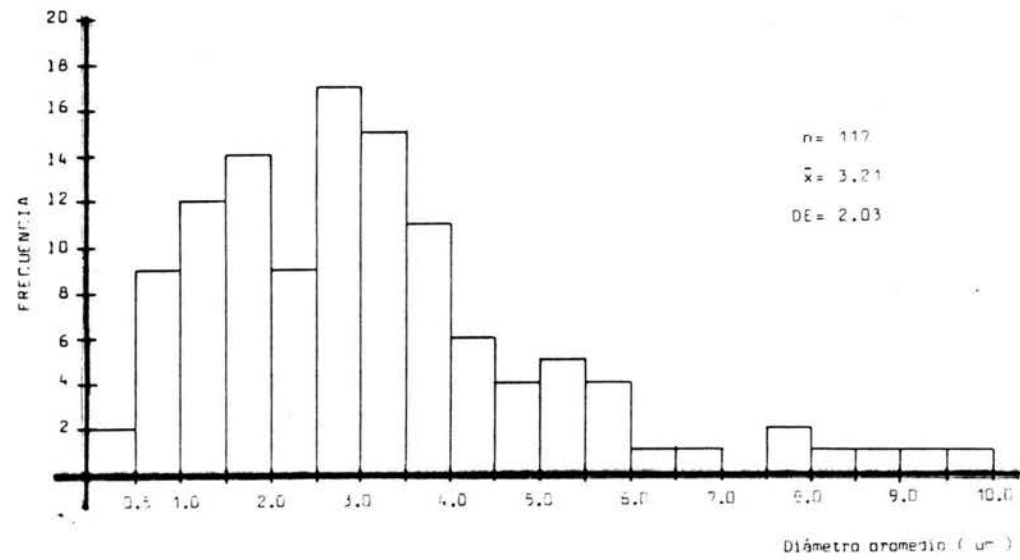


Fig. 1

tratarlos con ultrasonido antes de cada estudio. Este tratamiento, además de homogeneizar la suspensión de partículas, provoca la ruptura de algunos polvos resultando partículas más pequeñas (demostrado por MEB v planimetría) (Cuadro 1).

A cada uno de éstos polvos se les hizo Microanálisis de Rayos X* y de él resultó que el cuarzo es un cristal compuesto por silicio, el asbesto crisotilo es una fibra de silicato de magnesio; el Fe carbonilo, su nombre lo indica; el polvo L-103, además de estar compuesto por un silicato de aluminio. también contiene partículas tales como S, K, Cl, Ca y, el Polvo de Mexicali (ver introducción), está compuesto por un silicato de aluminio y potasio (Fig. 2).

Sistemas "in vitro"

1. Determinación de Actividad Hemolítica.

1.1 Actividad Hemolítica de PM (10 µm) a concentraciones altas de eritrocitos (1.2%) y de polvo.

De la incubación de eritrocitos con concentraciones crecientes a partir de 0.5 mg de PM/ml, resulta una gran liberación de Hemoglobina (Hb), observando el máximo de liberación (93.7% de hemólisis) cuando es incubada una concentración de 1 mg/ml de PM (Fig. 3). A concentraciones mayores de polvo se obtiene una disminución en la cantidad de Hb libre, pero suponemos que-

CUADRO 1

POLVOS INORGANICOS

TAMAÑO $\bar{x} \pm$ D.E.

μm

Polvo	S/Sonicar	Sonicado
Mexicali	3.2 \pm 2.0	1.8 \pm 0.9
Cuarzo	2.6 \pm 1.6	3.4 \pm 2.2
Fe carbonilo	1.6 \pm 0.7	1.5 \pm 0.6
Lab. 103	4.2 \pm 3.4	2.5 \pm 1.5

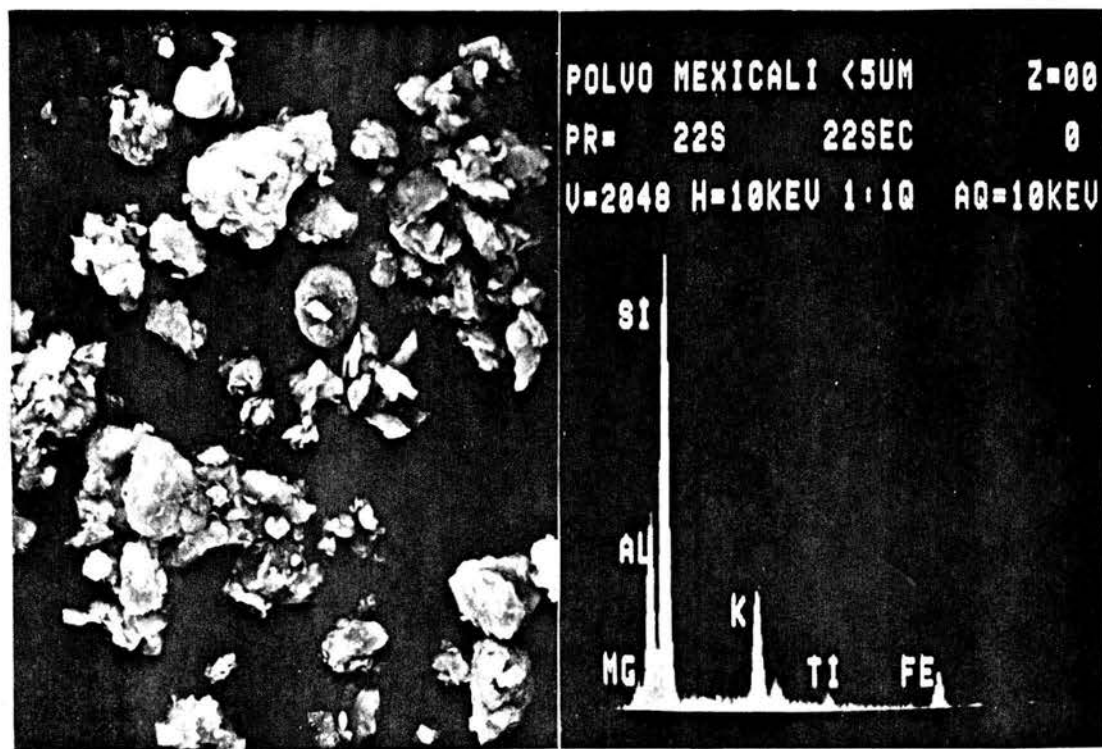


Fig. 2. Aspecto del PM al MEB y Microanálisis de Rayos X que revela la composición del -- polvo.

Actividad Hemolítica de Polvo de Mexicali.

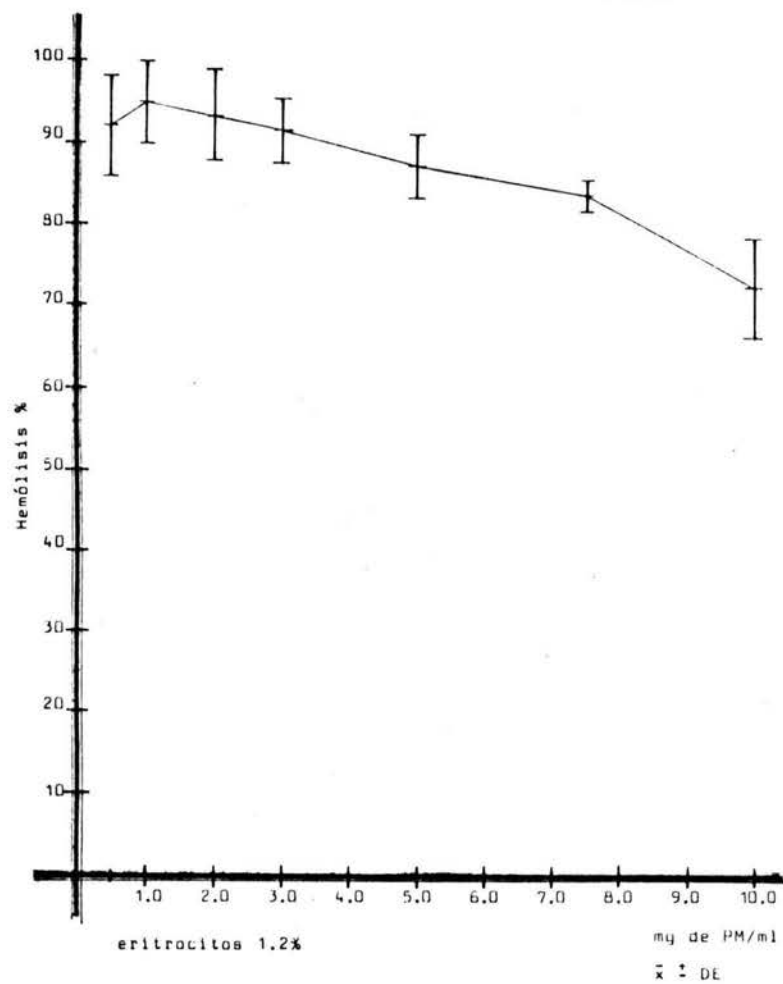


Fig. 3

debida a la adsorción de ésta por el polvo.

1.2 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μ m) a concentraciones altas de polvo y muy-baja concentración de eritrocitos (0.08%).

Los resultados mostrados en la Fig. 4, revelan que el PM desarrolla un máximo de hemólisis de 45.7% cuando es usado a una concentración de 0.5 mg - de PM/ml y una concentración de eritrocitos al 0.08%. A partir de aquí, - el porcentaje de hemólisis disminuye, no por un menor potencial tóxico del polvo, sino como suponen Singh y cols (12), es debido a la adsorción de -- Hb por este polvo.

Esto se demostró al observarse los sobrenadantes resultantes de la centri-fugación: a concentraciones mayores de 1.0 mg/ml de polvo, el sobrenadante tiende a ser transparente y el sedimento final contiene polvo teñido de ro-jo; este color, no se relaciona con la sedimentación de células sino con - la Hb adsorbida. Esto significa que a mayor cantidad de polvo, la Hb libe-rada cubre las partículas, quedando enmascarada la liberación.

1.3 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μ m) y controles a baja concentración de -- eritrocitos (0.6%) y polvos.

Actividad Hemolítica de Polvo de Mexicali.

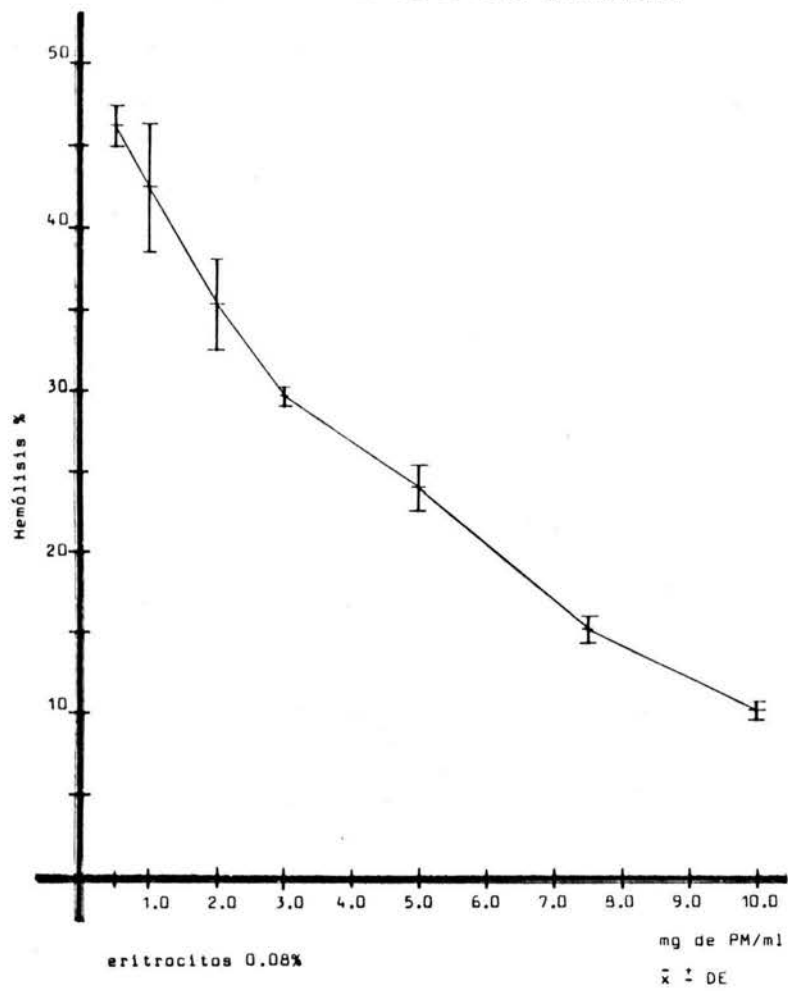


Fig. 4

Trabajando con PM de 3.2 μm a bajas concentraciones fue observada una curva de hemólisis que muestra que la Hb liberada al medio, es proporcional a la cantidad de polvo incubada. El porcentaje del total de lisis, alcanza un máximo de $93 \pm 3.2\%$ cuando son incubados 2.5 mg de PM/ml con eritrocitos (Fig. 5). Es a partir de la concentración de 1.0 mg/ml de PM ($81 \pm 6.2\%$) donde la liberación de Hb se mantiene más o menos estable.

En comparación con los controles positivos, es notoria la mayor capacidad hemolítica del PM (93%) que aquella inducida por cuarzo, que sólo alcanza un $36.8 \pm 1.5\%$ y la de asbesto crisotilo, que tan solo provoca $23.2 \pm 1.1\%$ cuando todos han sido incubados a la misma concentración en peso. El Fe carbonilo que, como sabemos es inerte, origina menos hemólisis: un $9.6 \pm 1.6\%$. De la misma manera actúa el polvo L-103 que demuestra tener un bajo potencial hemolítico pues libera sólo un $6.2 \pm 1.3\%$ de la Hb total.

1.4 Actividad Hemolítica de PM (3.2 μm) y controles, a bajas concentraciones de eritrocitos (0.6%), ajustando el número de partículas por ml de suspensión.

Por las diluciones hechas para ajustar el número de partículas, encontramos que en 1 mg de cada polvo, están contenidas 78'786.480 partículas de cuarzo, 70'641,899 partículas de Fe carbonilo y 343'909,280 partículas de

Actividad Hemolítica de Polvos Inorgánicos.

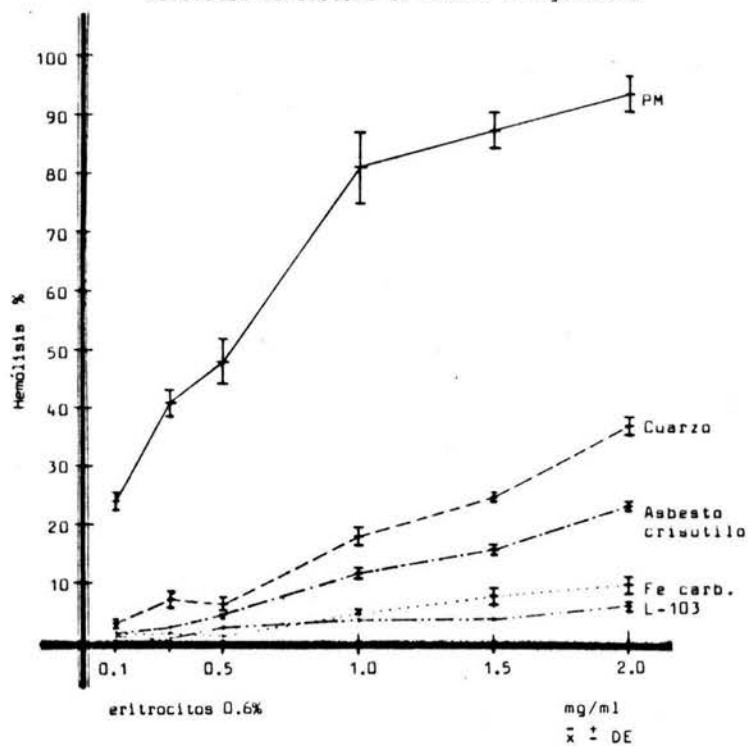


Fig. 5

PM. En relación al PM, se observó que éste posee 4.36 veces más partículas que el cuarzo y que éste, a su vez, presenta una relación de 1:0.89 -- partículas con el Fe carbonilo (Cuadro 2).

Al incubarse éstos polvos con eritrocitos, se detecta, según se muestra en la Fig. 6, que el PM alcanza un máximo de 61.7% de actividad lítica cuando son incubadas 118.5×10^6 partículas de PM/ml y que la hemólisis inducida por este polvo es mayor a la que presentan el mismo número de partículas - de cuarzo, ya que éste sólo induce un 34.7% de hemólisis máxima y es todavía mayor a la producida por Fe carbonilo (16.9%) a la misma concentración de partículas.

Tomando en cuenta los Errores Estandar que presentan los resultados mostrados, podríamos decir que es a una concentración de 79×10^6 partículas/ml (para todos los casos), donde se encuentra el máximo de hemólisis. A la concentración restante (118.5×10^6 partículas/ml), la liberación de Hb se mantiene estable. Estos resultados son similares a los reportados en los estudios anteriores.

Tanto en este último estudio sobre Actividad Hemolítica como en los anteriores, el PM ha demostrado ser más hemolítico que los controles positivos, cuando todos ellos han sido trabajados en paralelo.

CUADRO 2

POLVOS INORGANICOS

No. de partículas / mg.

Fe	70'641,899	(0.89)
Cuarzo	78'786,480	(1.00)*
P.M.	343'909,280	(4.36)

Actividad Hemolítica de Polvos Inorgánicos

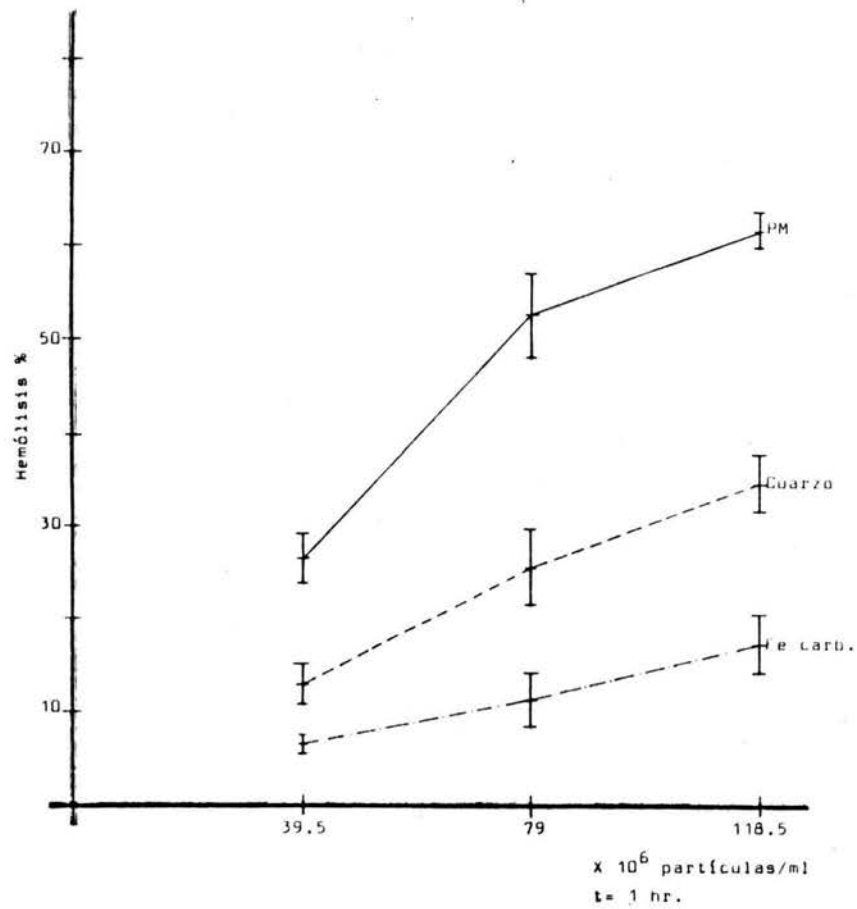


Fig. 6

2. Incubación de Macrófagos con Polvos Inorgánicos.

2.1 Estudio Comparativo de PM con Polvo Inerte.

Este estudio mostró que cuando se incuban macrófagos alveolares con una -- concentración de 0.3 mg de PM/ml, éste es capaz de provocar la liberación de Deshidrogenasa Láctica (DHL), lográndose un máximo de 53% equivalente a 30 U/l de DHL, cuando son incubadas por un período de 2 hrs (Fig. 7). Comparado con Fe carbonilo, del cual se sabe que es inerte e induce una liberación del 11% (4.9 U/l de DHL), se puede asegurar que el PM posee un alto potencial de daño celular. Se puede pensar que esta cantidad de enzima libre no sólo proviene de macrófagos dañados, sino también de eritrocitos -- provenientes del lavado pulmonar: las cuentas diferenciales realizadas en cada estudio mostraron que, en promedio, los fluídos celulares contenían - un 85% de macrófagos y que el 15% restante corresponde a linfocitos (2.6%) eritrocitos (12%) y, en una mínima proporción, a polimorfonucleares (0.4%) (Fig. 8).

De la incubación del control sin polvo, se obtienen los datos que se muestran en la Fig. 9, en la que es posible constatar que la muerte espontánea de las células (determinada por exclusión con azul tripán) (Fig. 10), es - proporcional a la cantidad de enzima (U/l de DHL) liberada al medio: se -- observa una viabilidad de $95.7 \pm 2.6\%$ correspondiente a una liberación míni

Lesión a Macrófagos Alveolares por Polvos Inorgánicos

Actividad de DHL en el Sobrenadante

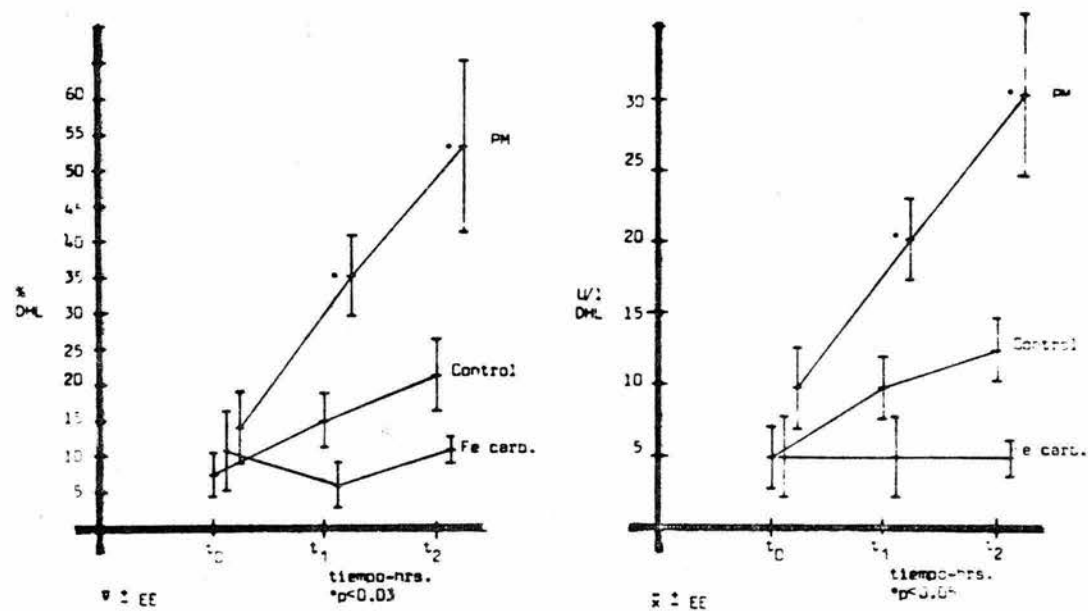


Fig. 7



Fig. 8. Aspecto de los macrófagos alveolares al Microscopio de Luz, en un frotis para cuenta diferencial.
(H&E, 200X).

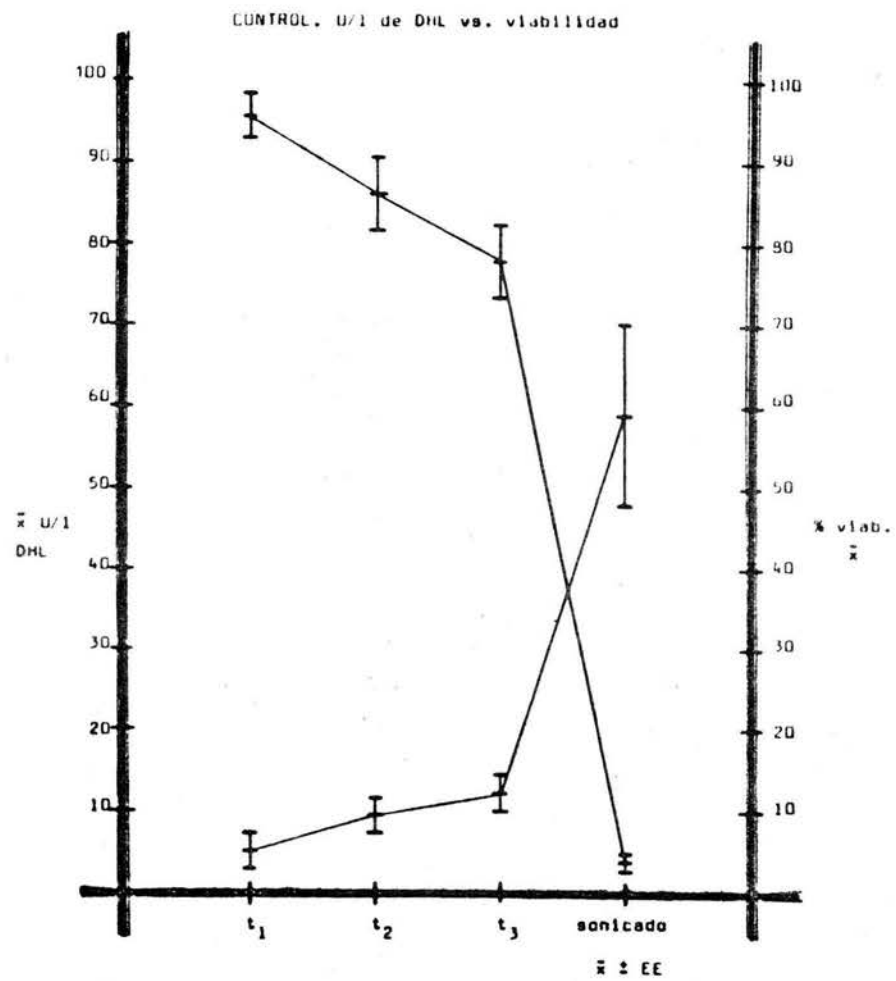


Fig. 9



Fig. 10. Viabilidad celular, aspecto al Microscopio de Luz de los Macrófagos vivos y muertos (flecha), cámara de Neubauer. (azul tripán, --- 300X).

ma de 4.9 ± 2.4 U/l de DHL a un tiempo 0 de incubación. Por el contrario, a una viabilidad de $3.7 \pm 0.9\%$ encontramos un máximo de 59 ± 11.5 U/l de DHL liberada en la alícuota que actúa como control de liberación total de enzima (sonicado) (Fig. 9).

Esta misma proporción se espera en caso de inducir daño celular por polvos inorgánicos, en mayor o menor grado, dependiendo del polvo en estudio.

La liberación relativamente alta de enzima en el caso del control sin polvo y del Fe carbonilo, se deben en gran parte a que es necesario centrifugar las células para poder obtener el sobrenadante, lo cual origina un cierto grado de rompimiento celular (Fig. 11).

En el caso del control de liberación total de enzima, el tratamiento con ultrasonido no resultó adecuado del todo: permanece un 3% de viabilidad celular, además de que se genera calor; por estas razones fue necesario cambiar el método de obtención para efectuar los estudios posteriores.

2.2 Estudio Comparativo del PM con un Control Positivo y un Polvo Inerte.

Los resultados presentados en la Fig. 12, muestran la lesión a macrófagos por los polvos inorgánicos: PM, cuarzo y polvo L-103. Se observa claramente que el PM es capaz de inducir la liberación del $54 \pm 3.2\%$ de DHL, cuando 0.3 mg de PM/ml son incubados con macrófagos durante 2 hrs. A tiempos me-

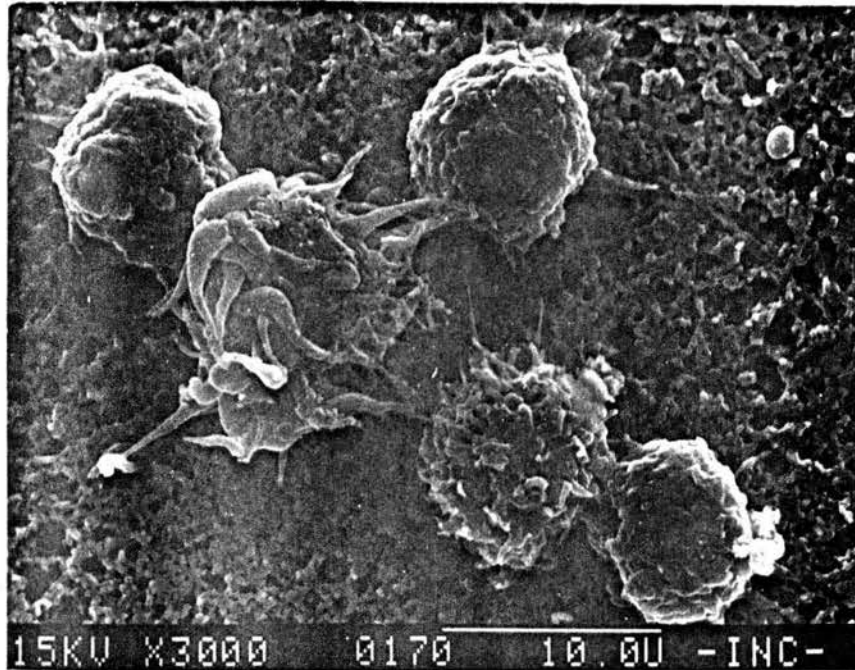


Fig. 11. Aspecto de los Macrófagos normales
(control), al MEB (3 000x).

Lesión a Macrófagos Alveolares por Pulvos Inorgánicos
Actividad de DHL en el Sobrenadante

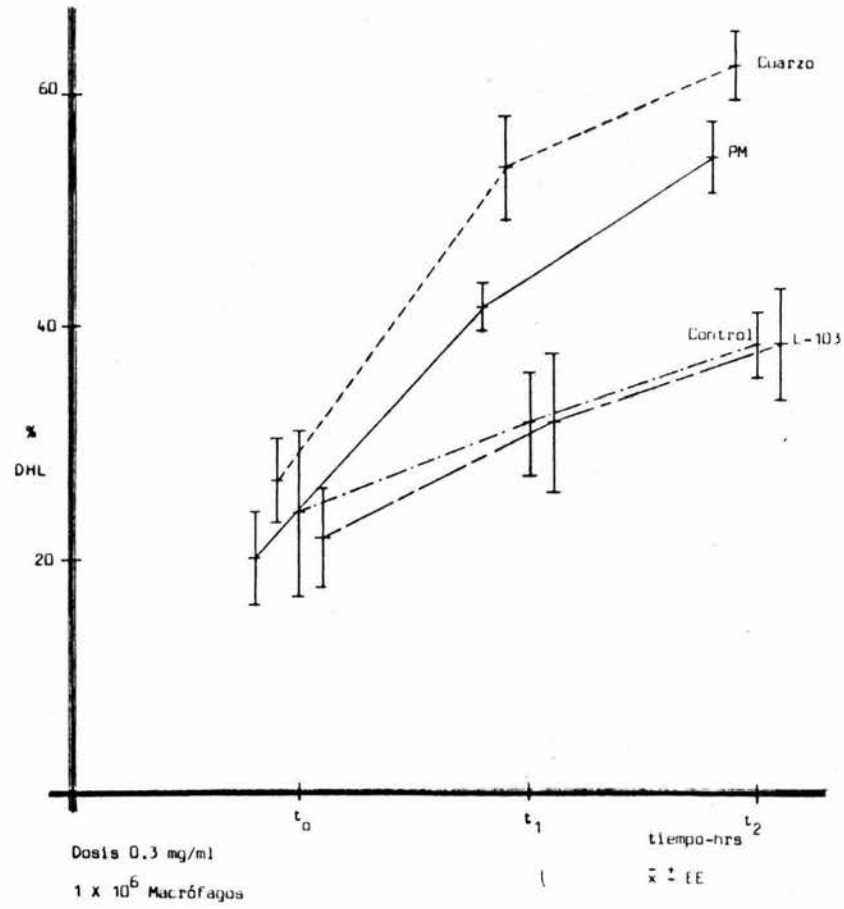


Fig. 12

nores, también hay liberación de DHL pero en menor cantidad. En todos los casos, al tiempo 0, el PM y controles presentan mas o menos ($\bar{x} \pm EE$) la misma actividad de DHL.

La liberación inducida por PM, es menor a la que presenta el cuarzo ($62 \pm 3.2\%$ de DHL), que se sabe posee una alta capacidad de daño a macrófagos. Comparando ambos resultados, podemos asegurar que el PM tiene un alto potencial citotóxico como lo ha demostrado en estos estudios y en los realizados con eritrocitos.

El polvo L-103, al comportarse semejante al control de liberación espontánea de enzima asegura que no tiene efectos sobre membranas celulares, o bien, que forma parte de los polvos "inertes" como el Fe carbonilo. Esto es en base a los estudios hechos en que el polvo L-103 muestra efectos casi nulos, que bien pudieran ser debidos a las condiciones de trabajo.

3. Análisis Microbiológico.

El análisis microbiológico realizado al PM fue puramente microscópico y -- reveló la presencia de Bacillus sp. (Gram +), Staphylococcus sp. (cocos -- Gram +), presumiblemente no patógenos por las características que presentaron las colonias en el medio 110: las colonias de Staphylococcus no desarrollaron color dorado (pigmento), como cabría esperarse en el caso de que

fueran patógenas. Cabe mencionar que para asegurar que se trataba de una especie avirulenta, se hubiera tenido que efectuar la prueba de la coagulasa. Finalmente fueron observados bacilos Gram -, identificados microscópicamente como Enterobacterias.

Estos resultados que se reportan corresponden sólo a los microorganismos - más importantes que fueron observados en los frotis realizados a las diferentes colonias que desarrollaron en los medios de cultivo antes mencionados.

DISCUSION.

Este trabajo permitió la aplicación de sistemas "in vitro" para evaluar los -- efectos tóxicos de un polvo ambiental: el Polvo de Mexicali (PM) y establecer su posible asociación con enfermedades pulmonares.

Para realizar los estudios correspondientes, inicialmente fue necesario contar con partículas de $\leq 5 \mu\text{m}$ semejantes a las que son inhaladas y retenidas en los pulmones. Una vez aisladas se tuvo que identificarlas y obtenerlas en cantidades apropiadas.

Su separación se logró por gravimetría en mallas, de las que se obtuvo una -- fracción final cuyas partículas tenían un tamaño promedio de $10 \mu\text{m}$, por tanto, fue necesario desarrollar un método que separara de ésta fracción a las partículas más pequeñas. Dicho método consistió en llevar a cabo la sedimentación de PM en agua bidestilada: las partículas obtenidas de esta manera cuentan con un tamaño promedio de $3.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ (determinado por MEB y planimetría).

El Microanálisis de este polvo mostró que sólo un 3% de estas partículas están compuestas únicamente por silicio y que el 83% corresponde a partículas de silicio, aluminio y potasio. Estas últimas, por Difracción de Rayos X, fueron identificadas como feldespatos. Esta composición es, en proporción, muy semejante a la de la tierra común, pues se sabe que ésta está constituida princi--

palmente por oxígeno y silicio, y, en menor cantidad, por aluminio y trazas de magnesio, potasio, sodio, calcio, etc..

Entre los efectos tóxicos más fácilmente observables, inducidos por polvos inorgánicos, se cuentan aquellos en los que se provoca lesión a membranas celulares y, por tanto, ocurre la liberación de componentes citoplásmicos cuantificables. Tal es el caso de los eritrocitos, los cuales sirven como modelo para investigar lesión a membranas y en los que la actividad hemolítica de polvos inorgánicos puede valorarse mediante la liberación de hemoglobina: la medición de esta proteína citoplásmica se realiza espectrofotométricamente, pues además de obtenerse una muy aceptable sensibilidad, no se requiere de reactivos que actúen como indicadores de lesión y el hecho de que la hemoglobina (Hb) permanezca mas o menos estable, no obliga a realizar lecturas inmediatas.

Para valorar la actividad hemolítica de PM, se usaron como polvos de referencia: asbesto crisotilo y cuarzo, a los cuales se les ha comprobado actividad hemolítica "in vitro".

Allison (1971), Summerton (1977), Brody (1983) y Singh (1983), realizaron estudios sobre las propiedades hemolíticas de asbesto (crisotilo) y cuarzo, encontrando que ambos son altamente hemolíticos y capaces de producir lesión celular; este potencial tóxico está dado, principalmente, por las características físico-químicas de las partículas, tales como: forma, tamaño y carga.

En el caso del asbesto crisotilo, su potencial es debido a la carga positiva - de la superficie de la fibra, conferida por Mg^{2+} ; la cual interacciona con las cargas negativas de los residuos de ácido siálico que se encuentran en la membrana de los eritrocitos: esta unión provoca tal aumento en la permeabilidad - de la membrana que finalmente resulta en hemólisis.

Las partículas de sílice también pueden interaccionar con la membrana celular. Los eritrocitos son fácilmente lisados por varias formas de sílice cristalino, entre ellas, destacan: el cuarzo, la tridimita, cristobalita y stishovita (en orden decreciente de actividad hemolítica). Los modelos experimentales en los cuales se analiza al sílice, han demostrado que se generan uniones entre los - grupos silanólicos del ácido silícico (formado de la hidratación del sílice) y las amidas secundarias de las proteínas de la membrana de los eritrocitos: como consecuencia de estas uniones de hidrógeno, las proteínas son extraídas de la membrana provocando defectos en esta y, por ende la liberación final de la Hb (13).

Comparando los efectos de estos polvos inorgánicos con los inducidos por PM -- (10 μm), éste resulta tener una capacidad hemolítica del 93%. Este primer estudio mostró también, una engañosa relación inversa entre la concentración usa da de PM y sus efectos, pues a concentraciones mayores de 1 mg/ml, se observó una disminución en la cantidad de Hb libre.

Los estudios realizados por Singh y cols. (12), sugieren que esta disminución en la curva puede ser debida a la adsorción de Hb por el polvo. Para observar ésto más claramente, o a fin de demostrarlo, se decidió realizar un segundo estudio de hemólisis empleando altas concentraciones de PM (3.2 μ m) y bajas concentraciones de eritrocitos (0.08%): la Hb liberada de la hemólisis provocada por 0.5 mg de PM/ml fue máxima y, a concentraciones mayores, la Hb libre fue disminuyendo; el decremento en cuestión fue proporcional a un aumento en la coloración rojiza del PM, sin que ésta estuviese relacionada con la sedimentación de eritrocitos. A una concentración final de 10 mg/ml, el sobrenadante apareció incoloro y manifestó un mínimo de absorbancia. Estas observaciones hacen suponer que el PM, desde la primera concentración utilizada, ha adsorbido la Hb impidiendo que ésta sea cuantificada en forma libre.

El estudio comparativo de PM (3.2 μ m) y otros polvos, permitió observar la proporcionalidad existente entre la cantidad de Hb libre y la concentración de polvos utilizada (relación dosis-efecto). Esta proporcionalidad que presentó el PM (93% de hemólisis), fue similar a la que presentaron el cuarzo y el asbesto crisotilo (36.8 y 23.2% de hemólisis respectivamente), a diferencia de Fe carbonilo (inerte) y el polvo L-103, en los que la curva de hemólisis permanece estable. Este último polvo, al desarrollar un mínimo de hemólisis, fue considerado dentro del grupo de polvos "inertes" o como control negativo.

Los estudios hasta aquí realizados, demostraron relación entre el tamaño y concentración del PM y los efectos tóxicos que aparecen. Estos son atribuidos a su composición rica en feldespatos (silicato de aluminio), que representa el 83% de sus componentes y no al de dióxido de silicio que corresponde sólo a un 3%. Si el potencial tóxico de este polvo fuese debido al dióxido de silicio, se esperaría una menor actividad hemolítica que la observada con nuestro control de cuarzo puro.

Sin embargo, había que descartar el papel del número de partículas empleadas, ya que el PM es de menor densidad que el cuarzo. Por lo tanto, era muy probable que los eritrocitos quedaran expuestos a un mayor número de partículas de PM que de cuarzo cuando se emplearon las mismas unidades de peso. Era de suponerse entonces, que si equilibramos la cantidad de partículas incubadas, la curva de hemólisis del PM sería diferente, tomando en cuenta que al igualar el número de partículas, el área de contacto del PM sería menor (diámetro promedio del PM = $3.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$).

Se ajustó el número de partículas cuantificándolas por mg de polvo. De este conteo por MEB resultó que el PM posee 4.36 veces más partículas que el cuarzo y, a la vez, 4.38 veces más que el Fe carbonilo.

Al incubar la misma cantidad de partículas de los polvos (79×10^6 part/ml -- con eritrocitos al 0.6%, encontramos que el PM es más hemolítico que el cuarzo.

Estos resultados, comparados con los anteriores, demuestran que, a pesar de -- que el PM presenta una menor área de contacto con los eritrocitos y, por tanto, es menor su cantidad en peso, éste resulta ser más hemolítico que el cuarzo. En conclusión, los efectos hemolíticos del PM son dependientes de su tamaño, - concentración, número de partículas y composición.

Sin embargo, por el hecho de que sea altamente hemolítico, no puede asegurarse que posee la misma capacidad de daño sobre células especializadas: los macrófagos alveolares, los cuales "in vivo," entran inicialmente en contacto con los - polvos y son los responsables de su eliminación (cuando ésta es posible).

En el extranjero se han realizado una gran variedad de estudios tanto "in vivo" como "in vitro", con macrófagos, utilizando principalmente cuarzo como polvo - problema. En los sistemas "in vitro" se ha demostrado su alta capacidad para - inducir daño a membranas celulares, la cual ha mostrado correlación con su capacidad fibrogénica "in vivo". Aún así, no se ha logrado establecer el meca-- nismo mediante el cual el cuarzo desarrolla tales efectos citotóxicos y fibro-- génicos.

Una vez demostrada la capacidad del PM para producir daño sobre la membrana de los eritrocitos, restaba saber si este polvo se comportaba de la misma manera - sobre macrófagos alveolares "in vitro", ya que este estudio nos proporcionaría una idea más real sobre su citotoxicidad.

Al incubarse macrófagos alveolares con PM, se detectó que éste es capaz de inducir en aquellos la liberación de la enzima citoplásmica Deshidrogenasa Láctica DHL, con un máximo de 53%. Este porcentaje indica daño a la membrana celular, en comparación con el Fe carbonilo y el control de liberación "espontánea" de enzima, que inducen un máximo de 11 y 21% respectivamente.

Se menciona: liberación "espontánea" de enzima, porque como se observó, esta liberación enzimática alcanzó niveles mayores a los obtenidos con Fe carbonilo. Una explicación congruente sería: como es necesario centrifugar las células para separar el sobrenadante en que se medirá la actividad enzimática, dicho proceso puede inducir que se favorezca algún rompimiento celular. En este mismo control, se determinó que los efectos "espontáneos" observados, tales como la liberación de DHL al medio, se correlacionan con una disminución en la viabilidad celular y con un aumento en la destrucción de macrófagos. Estos resultados hicieron suponer que esta misma correlación se encontraría, aunque más -- acentuada, durante la incubación de células con polvos inorgánicos.

Para realizar un segundo estudio, que fuera comparativo con un control positivo, hubo que afectar algunos cambios en la técnica. Primero, se colectaron las células del lavado pulmonar en un solo tubo siliconizado, evitando así que las células se adherieran al tubo de vidrio; segundo, se distribuyeron en alícuotas equivalentes, de modo que no fue necesario corregir resultados por núme

ro de células y, tercero, con el fin de obtener una viabilidad del 0%, se agregó Tritón X 100 (0.2%), que origina una lisis celular total.

Con estas modificaciones, el segundo estudio con macrófagos demostró que el PM no posee un potencial tóxico mayor al del cuarzo, al menos sobre macrófagos alveolares. En este mismo estudio, el polvo L-103 nuevamente presenta un bajo potencial tóxico, con lo que podemos asegurar (apoyándonos en los resultados de hemólisis) que pertenece al grupo de los polvos "inertes".

Con el objeto de modificar y mejorar este sistema "in vitro", actualmente estamos en espera de equipo que nos permita realizar cultivos de macrófagos en monocapa. Estos cultivos poseen varias ventajas, entre ellas:

- Al quedar las células viables adheridas a la superficie del envase o del plato de cultivo, es más fácil que el polvo actúe sobre ellas.
- No es necesario centrifugar los cultivos con lo cual se evita la elevada liberación "espontánea" de enzima.
- Debido a la distribución en monocapa, es posible realizar estudios morfológicos, con lo cual podría tenerse una idea sobre el mecanismo de daño celular.
- Al ser prolongada la incubación (24 a 48 hrs) y efectuarse bajo condiciones controladas de esterilidad, oxigenación, temperatura, etc, hace posible determinar si el polvo es fagocitado por las células, cuantificando la liberación de enzimas lisosomales (Fosfatasa ácida, proteasas, β -glucuronidasa, --

etc).

El análisis microbiológico realizado al PM no identificó microorganismos tales como estafilococos patógenos o neumococos que pudiesen participar activamente en el desarrollo de enfermedades pulmonares. Sin embargo, debe tomarse en cuenta la capacidad que tiene el sílice para predisponer al individuo a adquirir algunas infecciones.

Allison y cols. (13) han reportado una marcada relación entre humanos silicóticos y enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis. Sus estudios han demostrado una mayor incidencia de tuberculosis en humanos afectados por sílice, que en aquellos no afectados. Aún más, se ha comprobado que las enfermedades inducidas en animales experimentales con este bacilo se ven agravados considerablemente mediante inyecciones o inhalaciones de sílice.

Aunque no hay evidencia de que el sílice interfiera en la respuesta del sistema inmune contra este agente etiológico, es probable que la respuesta del macrófago contra este bacilo se vea alterada en presencia del sílice: se ha logrado observar que, en cultivos de macrófagos, la virulencia del bacilo se ve potencializada por adición de sílice.

Ahora sabemos (comunicación personal) (35), que la Ciudad de Mexicali es considerada como una de las que posee mayor incidencia de tuberculosis y, conociendo el potencial tóxico del PM, se podría proponer la hipótesis de que exis

ta un posible sinergismo entre éste y el agente causal en el desarrollo de éste padecimiento. Sin embargo, esto requiere de estudios más profundos.

En suma, fue posible establecer una metodología básica que puede ser utilizada en el estudio de otros polvos con posibles efectos tóxicos discriminando su -- comportamiento como "inertes" o "citotóxicos". Así lo hemos hecho con el polvo L-103 y lo venimos realizando recientemente con un polvo de Salamanca sobre el cual tenemos antecedentes similares a los reportados en la paciente de Mexicali. Por otra parte los resultados obtenidos han permitido iniciar una serie de estudios "in vivo" en ratas, en los que se instila PM por vía tráqueal, trtando de reproducir las lesiones tisulares que se presentaron en la paciente, - variando dosis y tiempos de exposición con el fin de establecer una relación - dosis-efecto.

Ambos estudios, nos ayudarán a conocer el mecanismo de daño inducido por polvos ambientales, que podrían extenderse a cualquier otro tipo de polvo y, sobre todo, permitirán establecer su participación directa en el desarrollo de - las enfermedades intersticiales pulmonares, las cuales constituyen una interrogante de actualidad en nuestro país.

CONCLUSIONES.

Con respecto a los sistemas que determinan Actividad Hemolítica y los que valoran daño a Macrófagos Alveolares:

1. Son sistemas rápidos y poco costosos.
2. Resultan capaces de valorar la citotoxicidad "in vitro" de una gran variedad de partículas contaminantes.
3. El diseñado para emplear Macrófagos Alveolares, aun requiere de modificaciones que lo hagan mas exacto.
4. Ambos proporcionan una idea sobre la toxicidad "in vivo" de partículas contaminantes.
5. Hacen posible el estudio de los mecanismos citotóxicos de ciertas - partículas contaminantes.
6. Requieren complementarse con otras investigaciones para aportar soluciones al problema de contaminación en la Cd. de Mexicali.

Por lo que se refiere al Polvo de Mexicali (PM):

1. Resulta altamente hemolítico.
2. Su actividad hemolítica es dependiente de las concentraciones de -- eritrocitos y polvo, asi como del número de partículas.

3. Es capaz de dañar a Macrófagos Alveolares aunque no mas que el cuarzo (control positivo).
4. Podemos asumir que el feldespató, por ser el componente contenido - en mayor cantidad en él, es el responsable de su citotoxicidad.
5. Se requieren efectuar estudios más profundos para poder establecer- el mecanismo mediante el cual causa daño celular.

En cuanto a la importancia de los estudios "in vitro".

1. Son necesarios para valorar la presunta citotoxicidad inducida por- polvos inorgánicos.
2. Proporcionan una idea sobre la toxicidad de los polvos inorgánicos- "in vivo".
3. Son utiles para clasificar cualquier polvo inorgánico, en inertes o tóxicos.
4. Promueven el estudio detallado sobre los efectos de partículas con- taminantes.
5. Aportan información necesaria para el estudio del problema de la -- contaminación ambiental en México.

BIBLIOGRAFIA.

1. Osornio-Vargas A.R, Fortoul T, Cordero M, y cols. Identificación de partículas contaminantes atmosféricas en pulmones humanos de casos de autopsia. I. Cuerpos Ferruginosos. Patología 1983, 21; 109-123.
2. Harkov Ronald. Toxic air pollutants - Assessing their importance. Sci. - tot. Envir 1982 26; 67-85.
3. Morgan W, Clague H y Vinitiski S. On paradigms, paradoxes and particles. - Lung 1983, 161; 195-206.
4. Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica. Editorial Danae 1981, 6; 2184.
5. Scott A.M. Occupational Respiratory Disease (pneumoconiosis). CMA, August 1979, 12; 400-402.
6. Kaw JL y Zaidi SH. Effect of mica dust on the lung of rats. Exp Path 1973 8, 5: 224-231.
7. Brambilla Ch, Abraham J, Brambilla E y cols. Comparative pathology of silicate pneumoconiosis. Am J Pathol 1979, 149-163.

8. Policard A y Collet A. Deposition of siliceus dust in the lung of the -- inhabitants of the Sahara regions. Arch Indust Hyg Occup Med 1952, 5; 527-534.
9. Ostiguy GL. Summary of task force report on occupational respiratory disease (pneumoconiosis). CMA, August 1979, 121; 414-421.
10. Brown RC, Chamberlain M, Davies R y cols. A comparison of 4 "in vitro"-systems applied to 21 dusts. The "in vitro" effects of mineral dusts. -- Academic Press 1980; 47-52.
11. Nash T, Allison AC y Harrington JS. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. Nature, April 1966; 259-261.
12. Singh SV, Ballabh D y Rahman Q. Relationship between solubility and haemolytic effects of toxic dust. J Appl Toxicol 1983, 3, 1; 14-17.
13. Allison AC y Harrow MD. Lysosomes and toxicity of particulate pollutants. Arch Inter Med 1971, 128; 131-139.
14. Stalder K y Stöber W. Haemolytic activity of suspensions of different silica modifications and inert dust. Nature, August 1965, 207; 874-875.

15. Pernis B y Enrico C. The role of macrophages and immunocytes in the pathogenesis of pulmonary diseases due to mineral dust. Am Ind Med 1982, - 3; 133-137.
16. Timár M, Adamis Z, Tátray E y Ungváry G. "In vivo" and "In vitro" investigations of different dusts. The "in vitro" effects of mineral dusts. - Academic Press 1980; 319-322.
17. Sykes SE, Morgan A y Holmes A. The haemolytic activity of chrysotile asbestos. The "in vitro" effects of mineral dusts. Academic Press 1980, - 113-120.
18. Summerton J, Hoenig S, y cols. The mechanisms of hemolysis by silica and its bearing on Silicosis. Exp Mol Pathol 1977, 26; 112-128.
19. Brody AR, Gerwyn G y Hill L. Interactions of chrysotile and crocidolite-asbestos with red blood cell membranes. Lab Invest 1983, 49, 4; 468-475.
20. Depasse J. Mechanism of the hemolysis by colloidal silica. The "in vitro" effects of mineral dusts. Academic Press 1980; 125-130.
21. Richards RJ, George G, Hunt J y Tetley TD. The relationship between the hemolytic potencial of certain particulates and their reactivity at the -

- lung surface "in vivo". The "in vitro" effects of mineral dusts. Academic Press 1980; 323-332.
22. Brown EA. The adsorption of lipids from the erythrocyte surface by silica and alumina. J Cell Comp Physiol 1957, 50; 49-56.
23. Adams Dolph. Macrophages. Methods in enzymology 1979, LVIII; 494-506.
24. Zauvil A, Cohn M y Benson B. The differentiation of mononuclear phagocytes. J Exp Med 1965, 121; 153-169.
25. Brain Joseph. Macrophage damage in relation to the pathogenesis of lung-diseases. Env Health Perspec 1980, 35; 21-28.
26. Davies R. The effect of dust on enzyme release from macrophages. The -- "in vitro" effects of mineral dusts. Academic Press 1980; 67-74.
27. Warheit D, Hill L y Brody AR. Surface morphology and correlated phagocytic capacity of pulmonary macrophages lavaged from the lungs of rats. -- Exp Lung Res 1984, 5; 138-1 - 12.
28. Daniel H y Le Buffant L. Study of a quantitative scale for assessing the cytotoxicity of mineral dusts. The "in vitro" effects of mineral dusts.- Academic Press 1980; 33-40.

29. Allison AC, Harington JS y Birbeck M. An examination of the cytotoxic -- effects of silica on macrophages. J Exp Med 1966, 124; 142-154.
30. Allison AC. Mechanisms of macrophage damage in relation to the pathogene -- sis of some lung diseases. Lung Biology in Health and Disease Monograph- 5. Ed. Marcel Dekker N.Y. 1977; 1075-1102.
31. Bertin EP. Introduction to x-ray spectrometric analysis. Plenum Press - 1978, NY.
32. Roub L, Dekker A. Pulmonary Silicatosi. Case reports. Am Soc Clin -- Pathol 1979; 871-875.
33. Osornio Vargas AR, Yáñez A, Alvarez A y Castellanos M. Citotoxicidad y - lesión pulmonar inducida por polvo ambiental: feldepatos. Patología -- 1984, 22, 2; 217.
34. Zar JH. Bioestadistical Analysis. Prentice Hall, Inc. 1974 Englewood -- Cliff, NJ.
35. Comunicación Personal. Arq. Jose Luis Yáñez quien residió por muchos años en la Ciudad de Mexicali.