



NIVELES DE INTERLEUCINAS PRO-INFLAMATORIAS EN EL SUERO Y SOBRENADANTE DE CULTIVO LINFOCITARIO DE INDIVIDUOS JÓVENES SANOS EXPUESTOS A DIFERENTES NIVELES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.

Por

Q.F.B. Ana Cecilia González Villegas

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(AREA DE INMUNOLOGÍA)

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSTARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

2001

Handwritten signature or initials in the bottom left corner.

NIVELES DE INTERLEUCINAS PRO-INFLAMATORIAS EN EL SUERO Y SOBRENADANTE DE CULTIVO LINFOCITARIO DE INDIVIDUOS JÓVENES SANOS EXPUESTOS A DIFERENTES NIVELES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.

Por Q.F.B. Ana Cecilia González Villegas

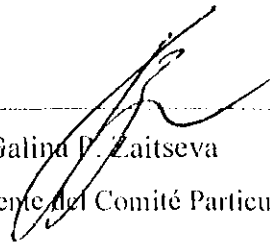

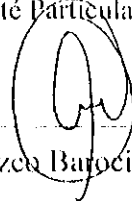


Tesis presentada como requisito para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (ÁREA DE INMUNOLOGÍA)

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Aprobada por:

 Dra. Galina P. Zaitseva Presidente del Comité Particular del estudiante	<u>09.07.01</u> Fecha
 Dra. Valentina Davydova Belitzkaya Asesor del Comité Particular del estudiante	<u>9 / 07 / 2001</u> Fecha
 Dr. Arturo Orozco Barocio Asesor del Comité Particular del estudiante	<u>9 Jul 2001</u> Fecha
 M.C. Ma. Luisa Pita López Asesor del Comité Particular del estudiante	<u>9 Jul 2001</u> Fecha
 Dra. Anne Santerre Lucas Asesor del Comité Particular del estudiante	<u>9 Julio 2001</u> Fecha

DEDICATORIAS

A Ulises y Abril

Por los cuentos no leídos que este trabajo nos impidió.
Por el sentido tan hermoso que dan a mi vida.

A Mauricio

Por tus adorables manos tibias.
Porque has llenado mi vida de amor.

A Virginia y Baltazar.

Mis Padres, que me han enseñado a luchar por todo lo que quiero en la vida.

AGRADECIMIENTOS

- Especialmente a mi maestra y directora de tesis Dra. Galina Zaitseva, por su gran apoyo y coraje para animarme con sus consejos en la Inmunología y en la vida durante esta nueva etapa de mi formación académica.
- A la Dra. Valentina Davydova, por su invaluable cooperación y asesoría en el área de contaminación ambiental.
- A la M. C. Ma. Luisa Pita López, amiga y comadre, mi apoyo indispensable para la realización de la parte experimental de este trabajo.
- A la Dra. Anne Santerre, mi maestra y amiga.
- Al Dr. Arturo Orozco Barocio, y a todos los anteriores, porque aceptaron ser mis asesores y sinodales en mi examen de grado.
- A la Lic. Margarita Orozco, por su valiosísima asesoría en la parte Estadística de este proyecto .
- Al Ingeniero Químico Mario Enrique García Guadalupe del Instituto de Astronomía y Meteorología de la U de G quien realizó la medición de los contaminantes ambientales en Tlajomulco de Zúñiga durante los días del muestreo.
- Al Dr. Everardo Montoya por su importante apoyo durante el muestreo de este trabajo.
- Al Dr. Alfonso Islas, que fue un apoyo importante durante el inicio de esta etapa académica.
- A la COESE, hoy SEMADES (Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Ecológico Sustentable) por la aportación de los datos de concentración de los diferentes contaminantes atmosféricos.
- A la Universidad de Guadalajara.

EL TRABAJO EXPERIMENTAL QUE SUSTENTA ESTA TESIS FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS (CUCBA) DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, ADEMÁS DE CONTAR CON EL VALIOSO APOYO DEL LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE ASTRONOMÍA Y METEOROLOGÍA, DE LA MISMA UNIVERSIDAD.

ESTE TRABAJO FORMA PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD Y DAÑO INMUNOLÓGICO EN INDIVIDUOS EXPUESTOS A CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS DE LA ZONA CENTRO DE GUADALAJARA”, CLAVE DE SIMORELOS 19980302002, QUE BAJO LA RESPONSABILIDAD DE LA DRA. GALINA ZAITSEVA, LA ESCUELA DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA REALIZÓ EN COLABORACIÓN CON EL CIATEJ E IMSS.

INDICE

Contenido:	Página
Resumen	vi
Abstract	vii
I.- Introducción.....	1
II. Antecedentes científicos.....	4
III. Planteamiento del problema	36
IV. Objetivos	37
V. Material y Métodos	38
VI. Resultados	64
VII. Discusión	93
VIII. Conclusiones	97
IX. Anexos	101
X. Bibliografía	107
Anexo 1 Preparación de la curva de calibración para IL-6.	
Anexo 2 Preparación de la curva de calibración para IL-1 β .	
Anexo 3 Preparación de la curva de calibración para IL-1 α .	
Anexo 4 Preparación de la curva de calibración para TNF- α .	
Anexo 5 Tabla de datos de contaminación proporcionados por COESE.	
Anexo 6 Formato del cuestionario usado para la valoración médica.	

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que los **contaminantes del aire**: dióxido de nitrógeno (NO_2), dióxido de azufre (SO_2), ozono (O_3), monóxido de carbono (CO) y las partículas sólidas respirables (PM_{10}) incrementan los síntomas patológicos de las vías respiratorias, tanto en individuos sanos como con enfermedades respiratorias preexistentes.

El crecimiento y urbanización acelerada de los últimos años en la ciudad de Guadalajara ha traído consigo un aumento importante en los niveles de contaminantes atmosféricos que impacta en la salud de sus pobladores, pudiéndose monitorear a través del sistema inmune, que por su alta función sensorial reacciona a cambios mínimos del organismo ocasionados por los factores ambientales, generando la liberación de varias **citocinas** como la **IL-6**, la **IL-1**, la **IL-8** y el **factor de necrosis tumoral (TNF- α)**. Es decir que la acción pro-inflamatoria de los contaminantes ambientales puede ser mediada a través de la liberación de estas interleucinas.

Se han realizado investigaciones, donde se miden los niveles de **citocinas pro-inflamatorias** en células de epitelio bronquial, en lavados bronquioalveolares y de flujo nasal, que se liberan en respuesta a la exposición a algunos contaminantes, pero hay poca investigación de su liberación en suero sanguíneo y en sobrenadante de cultivos celulares.

En el presente trabajo se midieron los niveles de IL-6, IL-1alfa y beta, TNF- α , tanto **en suero** como en sobrenadantes de cultivos celulares de jóvenes masculinos seleccionados sanos del centro de la ciudad de Guadalajara, con altos índices de contaminación ambiental, en comparación con jóvenes sanos masculinos de la población rural de Tlajomulco de Zúñiga que cuenta con niveles muy por debajo de los de Guadalajara, por lo que los primeros están expuestos a mayor contaminación.

Se utilizaron muestras de sangre para realizar cultivos celulares y revisar la inmunoproliferación celular de ambas poblaciones y obtener los sobrenadantes y los sueros donde se midieron las **citocinas**, a través de kits comerciales de inmunoensayos ELISA, encontrando que **no hubo diferencias significativas** ($p < 0.05$) en ninguno de los parámetros inmunológicos medidos, notando sólo un incremento de la **IL-1alfa sérica** de Guadalajara sobre la de Tlajomulco que aunque no significativa, nos indica mayor sensibilidad en esta citocina a las modificaciones ambientales.

Los niveles de concentración de los 5 contaminantes mencionados, fueron monitoreados en ambas zonas de estudio los mismos días en que se tomaron las muestras, encontrándose más elevados los de Guadalajara que los de Tlajomulco, especialmente el O_3 , el CO y las PM_{10} aunque de acuerdo a la normativa mexicana de salud ambiental, todos estuvieron dentro de niveles satisfactorio y bueno, que no implican riesgos para la salud. Los anteriores resultados nos sugieren que los índices de contaminación prevalentes en la zona centro de Guadalajara al momento del presente estudio no modificaron de manera importante el sistema inmune de los individuos sanos del estudio.

Palabras clave: agentes contaminantes, vías respiratorias altas, inmunoproliferación, citocinas proinflamatorias.

ABSTRACT

Recently, it has been demonstrated that the **polluting agents of the air**: nitrous dioxide (NO_2), sulfur dioxide (SO_2), ozone (O_3), carbon monoxide (CO) and the breathable solid particles (PM_{10}) increase the pathological symptoms of the upper airway, as much in healthy individuals as those with pre-existing respiratory diseases.

The growth and accelerated urbanization of recent years in the city of Guadalajara have brought with it a significant increase in the levels of atmospheric polluting agents that impact the health of the population. This can be monitored through the immune system, which, by its high sensorial function, reacts to minimum changes of the organism caused by the environmental factors and generates the release of several **interleukins** like the **IL-6, the IL-1, the IL-8 and the tumor necrosis factor $\text{TNF-}\alpha$** . This is to say that the inflammatory effect of the environmental polluting agents can be measured by the release of these interleukins.

Investigations have been made, where the levels of **proinflammatory cytokines** are measured in human airway epithelial cells bronchial, in nasal lavage fluid, and in bronchoalveolar lavage fluid, that are released in response to the exposure to some polluting agents. But there is little investigation of this release in sanguineous serum and cell culture supernatant.

In this study, the levels of IL-6, IL-1 α , IL-1 β and $\text{TNF}\alpha$, **in serum** as well as in supernatants were measured in selected healthy young males from downtown Guadalajara, with high indices of environmental contamination. The same measurements were taken from selected healthy young males from the rural population of Tlajomulco de Zúñiga, which has low indices of environmental contamination in comparison to those of Guadalajara.

Blood samples were used to make cellular cultures and to review the cellular immunoproliferation of both populations and to obtain the culture supernatants and serums where the **cytokines** were measured with commercially available ELISA kits, finding that there were **no significant differences** ($p < 0.05$) in any of the measured immunological parameters. Only an increase in **serical IL-1 α** in Guadalajara over the one of Tlajomulco was noticed. Although this was not a significant increase, it indicates greater sensitivity in this cytokine than to the environmental modifications.

The levels of concentration of the 5 mentioned polluting agents (which were monitored in both zones of the study on the same days in which the samples were taken), were found to be higher in Guadalajara than Tlajomulco, especially O_3 , CO and PM_{10} . However, according to the Mexican standard of environmental health, all were within satisfactory levels and do not imply a health risk. These results suggest that the indices of prevalent contamination in the central zone of Guadalajara, at the time of the present study, did not modify, in a significant way, the immune system of the healthy individuals participating in the study.

Key words: polluting agents, upper airway, immunoproliferation, proinflammatory cytokines.

I.- INTRODUCCIÓN.

El valle de Atemajac, donde los colonizadores españoles fundaron la ciudad de Guadalajara en el siglo XVI, ha experimentado un rápido desarrollo en su población, los asentamientos urbanos, y el desarrollo de la industria en la segunda mitad del siglo XX. Es habitado por más de 5 millones de personas, y es considerado como el segundo más importante en actividad económica, después de la ciudad de México. Debido a sus altos niveles de actividad, la ciudad de Guadalajara tiene un serio problema ambiental: un incremento acelerado de los contaminantes en el aire y en el agua, una destrucción acelerada de sus áreas verdes y comparativamente, una actividad industrial con un alto consumo de agua y energía. Como consecuencia, el impacto debido a las actividades humanas sobre el ambiente tiene serios efectos sobre el clima del valle (Davydova *and* Skiba, 1999).

Estos cambios no solo están afectando el clima de la ciudad de Guadalajara, sino también la salud de sus pobladores. En años recientes, se ha demostrado que los contaminantes del aire, tales como el dióxido de nitrógeno (NO_2), el ozono (O_3) y los residuos de combustible que emanan de los escapes de los vehículos e industrias incrementan los síntomas patológicos de las vías respiratorias en individuos tanto en individuos sanos como con asma, alergias y/o con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (CODP). Existen evidencias de que las enfermedades de las vías respiratorias tales como el asma y las alergias están incrementadas tanto en incidencia como en prevalencia en muchos países occidentales altamente industrializados (Polinsbee, 1993). Los resultados de algunos estudios afirman que en las personas asmáticas el problema es aun mayor ya que son más sensibles a los efectos de los contaminantes del aire (Koren, 1995).

No hay una evidencia clara de cual es el umbral en el nivel de concentración "segura y aceptable" y muchas investigaciones apuntan a que los efectos en la salud se incrementan con los niveles de contaminación, debido a una clara relación dosis-respuesta (Pope, 1995). Sin embargo, se ha mostrado que cada individuo puede ser afectado de manera especial y distinta, entonces la evaluación de la exposición personal puede ser crucial en la determinación de los efectos en la salud atribuibles a diferentes concentraciones de contaminantes del aire (Watt *et al*, 1995).

La contaminación del aire es un problema mundial de salud pública. Una gran cantidad de contaminantes antropogénicos están presentes en la atmósfera, incluyendo ozono, dióxido de azufre (SO₂), dióxido de nitrógeno (NO₂), aerosoles ácidos y otros materiales sólidos particulados. Algunos contaminantes, incluyendo al ozono, SO₂ y NO₂ tienen acciones pro-inflamatorias. Cada uno de estos gases ha mostrado inducir un flujo de células inflamatorias dentro de las vías respiratorias y pueden también causar algunos cambios pro-inflamatorios en las células epiteliales, tales como la liberación de varias **citocinas**, que pueden ser fundamentales en la mediación de la acción inflamatoria de los contaminantes (Peden, 1997).

Los efectos de los contaminantes ambientales sobre el sistema inmune han sido más estudiados en el tracto respiratorio. La entrada de estos contaminantes puede ser en forma de un gas volátil (Ozono o benceno) o como gotas líquidas (ácido sulfúrico-lluvia ácida-, o dióxido de nitrógeno) o como materia particulada (combustible de los escapes, hidrocarburos aromáticos). La subsiguiente interacción con el sistema inmune puede dar como resultado una respuesta local estricta, mediada por los elementos del sistema inmune que residen en el tejido pulmonar y/o una respuesta sistémica que involucre el bazo y los nódulos linfáticos si el contaminante entra al torrente sanguíneo y se disemina por el cuerpo (East, 1991). Algunos estudios han demostrado la existencia de enfermedades que ocurren tanto por una respuesta inmune hiperactiva como por una inmunosupresión. Para la mayoría de los casos, los contaminantes ambientales (de bajo peso molecular) tienen que ser acoplados con otras sustancias (proteínas o conjugados) antes de que puedan ser reconocidas por el sistema inmune ocasionando desórdenes inmunológicos (Kleeberger *et al*, 1993).

Aunque se sabe de una clara relación entre las bases genéticas para la susceptibilidad a los desórdenes mediados inmunológicamente como resultado de la exposición a los contaminantes ambientales, el conocimiento en esta área es aún insuficiente. Los estudios sobre este tema han sido obstaculizados por la ausencia de modelos *in vitro* apropiados, así como por las dificultades para identificar la sustancia activa (Bernaudin *et al*, 1981 y Aten *et al*, 1988).

Ante las evidencias anteriores se denota la importancia que existe entre la relación: “**contaminación ambiental-salud humana**”. También es importante el papel específico que en todo esto tiene el sistema inmunológico, mediando los procesos inflamatorios que caracterizan los desórdenes en las enfermedades de las vías respiratorias en individuos expuestos a los contaminantes ambientales, lo cual puede ser evidenciado a través de ciertos marcadores de respuesta pro-inflamatoria como algunas moléculas de adhesión y algunas interleucinas.

En el presente estudio, se midieron algunos de estas interleucinas proinflamatorias que pudieran indicar el grado de relación existente entre los contaminantes ambientales de la ciudad de Guadalajara y la respuesta inmune de individuos jóvenes sanos expuestos a diferentes niveles de contaminación.

Los marcadores que se determinaron fueron la Interleucina-6 [IL-6], la Interleucina-1 alfa y beta, [IL-1alfa, IL-1beta] y el Factor de Necrosis Tumoral alfa [TNF-alfa], los cuales fueron seleccionados por su papel principal como mediadores de una respuesta inflamatoria.

Los parámetros ambientales que fueron paralelamente medidos son: el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre (SO₂), el dióxido de nitrógeno (NO₂), el ozono y las partículas sólidas respirables menores a 10 micrómetros (PM₁₀).

II.- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.

A).-Acerca de LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA (ZMG)

I.Ambiente

a)Topografía.

La ciudad de Guadalajara se ubica en una región geográfica cuyas coordenadas son latitud 20°41' N, longitud 103° 20' W, altitud 1578 m sobre el nivel del mar. Su zona urbana, con un área de 340 km², se sitúa principalmente sobre el valle de Atemajac, y está rodeada al norte y noroeste por una falla ecológica conocida como barranca de Huentitán-Oblatos el Alto, en el fondo de la cual corren los ríos Verde y Santiago. Al este se sitúa un macizo reolítico muy erosionado llamado Sierra de San Esteban. Al sur y al sureste, el valle de Toluquilla (también considerado parte de la ZMG), del cual es separada por una pequeña cordillera basáltica y algunos volcanes basálticos, como los cerros La Cúpula, de la Reina o de Tonalá y de Cholo. Al suroeste se encuentran varios cerros de altura importante como el del Cuatro, de las Juntas, Santa María de Tequepexpan y del Tesoro. Al oeste se limita por la sierra de la Venta del Astillero (Díaz, 1946). Esta cadena de cerros rodea al valle en forma de U, determinando su cuenca atmosférica y el régimen de los vientos locales. Alrededor de la ciudad se localizan pocas áreas boscosas, de las cuales la realmente importante y considerada como pulmón de la ciudad, es el bosque La Primavera, localizada en las afueras de la ciudad hacia el sur suroeste. El bosque (parque) Los Colomos se localiza dentro de la urbe y forma la zona verde más importante dentro de la ciudad. Otro objeto geográfico importante que influye sobre el clima de Guadalajara es el lago de Chapala (con un área de 1112 km²), que es el más grande de la República Mexicana, y que se halla a escasos 40 km al sur-sureste de la ZMG (Davydova *and* Skiba, 1999).

b) Climatología.

La ciudad de Guadalajara se encuentra en una zona climática templada, subhúmeda con lluvias en verano según la clasificación de Köppen. El período de lluvias (precipitación de 700 a 900 mm) comprende de mayo a octubre y el resto del año es la temporada de secas (precipitación menor de 70 mm). En estudios hechos por la Dra. Davydova y otros, se estima que el total anual de precipitación ha aumentado su valor de 866.9 mm (1886- 1964) a 969.00 mm, para el período de 1961 a 1996 (Davydova *and* Skiba 1999).

Al comparar las estadísticas del viento dominante de la Secretaría de Recursos Hidráulicos (SARH) (plan Lerma 1964) se aprecia una significativa degradación de la velocidad del viento dominante en la ZMG de 8.0 m/s (1881-1964) a 4.8 m/s (1960-1996). Este crecimiento está relacionado con el desarrollo de la ciudad: construcciones de edificios altos próximos a la estación climatológica y expansión de la zona urbana en general, originando el acrecentamiento del parámetro rugosidad y fuerzas de fricción. Sin embargo, el patrón de la distribución anual de velocidad del viento dominante sigue siendo el mismo para ambos períodos pues presentó vientos más intensos durante marzo, abril y mayo, conocidos como vientos alisios.

2. Desarrollo urbano.

a) Población.

La ciudad de Guadalajara fue fundada en 1542 con 563 familias indígenas y españolas. En 1850, inicia la industrialización de la región, con una población de 25 000 habitantes aproximadamente. En 1890, la población llegó a 90 000 habitantes y en 1900 ya sumaba más de 120 000. Para 1940 el total fue de 229 000 y veinte años después, alrededor de 736 800, que fue el 30 % de la población de Jalisco. En 1970, el total de la población rebasó 1 200 000 habitantes, aproximadamente el 36 % de toda la población del estado. En 1975 se denomina Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG) a la zona urbana de la capital, que había alcanzado e incorporado a las poblaciones de Tlaquepaque, Zapopan y unos años más tarde se integró al municipio de Tonalá. (Davydova *et al*, 1999). El análisis de datos de la población de Guadalajara, permitió observar un crecimiento de la población con un carácter exponencial, vaticinándose entonces (1995) que para el año 2010 se llegaría a 4.6 millones de habitantes aproximadamente, sin embargo, en la actualidad (2001) el crecimiento poblacional rebasó estas expectativas ya que ahora existen más de 5 millones de habitantes en la ZMG.

b) Transporte

En 1975, empezaron a registrarse índices crecientes de bióxido de azufre (SO₂) debido a que los autobuses del transporte público comenzaron a usar motores de diesel, factor de emisión de 6.5 g por cada kilómetro recorrido. En 1986 el parque vehicular de Guadalajara fue de más de 250 000 automóviles, en 1990 fue de 407 354 automóviles, camiones y ómnibus y en 1995 se detectaron 620 000 vehículos circulando en la ZMG,

contribuyendo con el 75 % de la contaminación que fue emitida al aire y que equivalió a una emisión total de 730 000 toneladas de contaminantes (González, 1995, Davydova *et al*, 1999).

e).- Industria

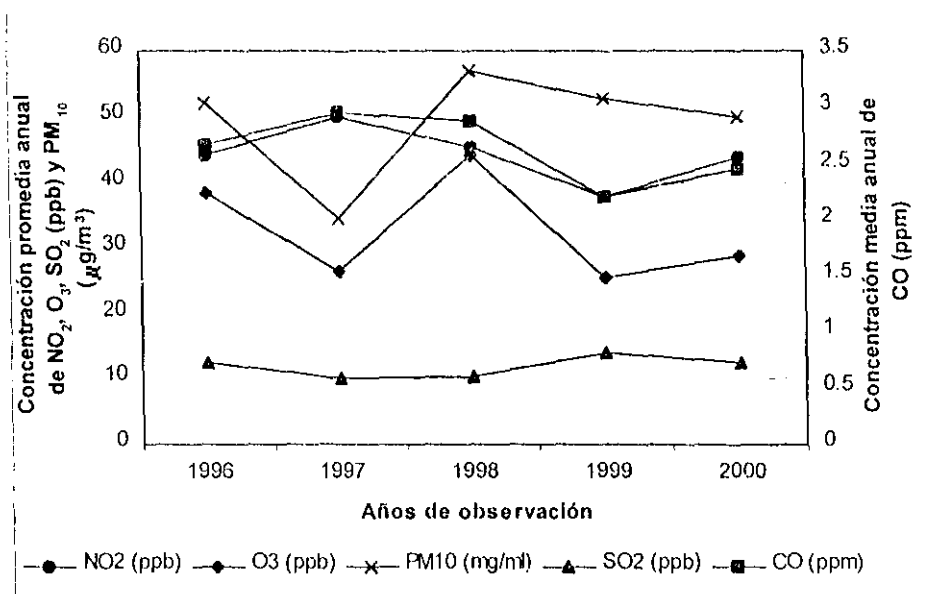
En 1850 (unos trescientos años después de su fundación), Guadalajara empezó su desarrollo industrial con la instalación de fábricas textiles e industrias tabacalera y tequilera. En 1888, la ciudad contó con 295 establecimientos. En 1960-1970 se fundó una zona industrial amplia en el sur de la región, que continúa creciendo de tal manera que a principio de los años ochenta la ZMG contó ya con trece zonas industriales (González 1995, Davydova *et al*, 1999). La cantidad de giros industriales contaminantes asentado en estas zonas fue de 6000, estimado durante la elaboración del Plan Estatal de Ecología del Estado, 220 de ellos fueron tipificados como de alta contaminación, siendo los principales: fundideras, cementeras, industrias químicas de productos ácidos y de plaguicidas, minerales no metálicos, fabricación de acumuladores y de grasas, aceites y derivados. Otros 1200 fueron tipificados como nivel medio de contaminación, destacando los giros de embutidos, bebidas, industria textil, huleras, curtidurías metálica básica y alimenticia. El resto de los giros se consideraron de bajo potencial de contaminación, siendo éstos principalmente de la rama de la industria del calzado, impresiones, plásticos, química general y de limpieza.

La Comisión de Ecología Estatal de Jalisco realizó una investigación para determinar la situación ecológica de la capital del estado. Los resultados mostraron que en la ZMG aproximadamente el 20 % de la contaminación del aire es debida a procesos industriales, lo que representa alrededor de 533 toneladas por día o 125 544 toneladas por año (González 1995, Davydova *et al*, 1999).

B).- Acerca del ESTADO ACTUAL DE LOS NIVELES DE CONTAMINACIÓN en la ciudad de Guadalajara.

En 1994 se registraron 70 % de los días con la calidad de aire no satisfactoria a mala, en 1995 fueron 74 % y en 1996 el total fue 77 % de los días que no responden a los estándares de calidad de aire establecidos por las normas mexicanas. (Davydova *et al*, 1999). En los siguientes años la contaminación tuvo altas en el año de 1998, bajó un poco en 1999 y se mantuvo constante en el año 2000. Lo cual se observa en la figura 1 [datos proporcionados por la Red Automática de Monitoreo Ambiental (RAMA) de la Comisión Estatal de Ecología COESE].

Fig. 1 Gráfica del comportamiento de los contaminantes en la zona centro de la ZMG durante los años 1996 al año 2000.



C).- Acerca de los DIVERSOS COMPONENTES del aire contaminado:

Los contaminantes medidos en la red de monitoreo del Instituto de Astronomía y Meteorología de la Universidad de Guadalajara, se deben a diferentes tipos de fuentes que se clasifican en dos grandes grupos: **fijas** (procesos industriales en empresas, fábricas, etc.) y **móviles** (automóviles, camiones urbanos, etc.) (Davydova *et al*, 1999).

GASES:

CO₂ (Dióxido de carbono).

Es un gas sin color, olor ni sabor que se encuentra presente en la atmósfera de forma natural. No es tóxico, desempeña un importante papel en el ciclo del carbono en la naturaleza, y cantidades tan enormes, del orden de 1012 toneladas, pasan por el ciclo natural de carbono, en el proceso de la fotosíntesis. Dada su presencia natural en la atmósfera y su falta de toxicidad, no se debería considerar una sustancia que contamina, pero, dos circunstancias lo hacen un contaminante de gran importancia en la actualidad: es un gas que produce un atrapamiento del calor, el llamado efecto invernadero; y su concentración está aumentando en los últimos decenios por la quema de los combustibles fósiles y de grandes extensiones de bosques. Por estos motivos es uno de los gases que más influye en el importante problema del calentamiento global del planeta y el consiguiente cambio climático (Echarri, 1998).

CO (Monóxido de carbono).

Es un gas sin color, olor ni sabor. Es un contaminante primario. Es tóxico porque envenena la sangre impidiendo el transporte de oxígeno; se combina fuertemente con la hemoglobina de la sangre y reduce drásticamente la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. Es responsable de la muerte de muchas personas en las minas de carbón, incendios y lugares cerrados (garajes, habitaciones con braseros, etc.). Alrededor del 90 % que existe en la atmósfera se forma de manera natural, en la oxidación del metano en reacciones fotoquímicas. Se va eliminando por su oxidación a CO₂. La actividad humana lo genera en grandes cantidades siendo, después del CO₂, el contaminante emitido en mayor cantidad a la atmósfera por causas no naturales. Procede, principalmente, de la combustión incompleta de la gasolina y el gasoil en los motores de los vehículos (Echarri, 1998).

CH₄ (Metano).

Es el más abundante y más importante de los hidrocarburos atmosféricos. Se forma de manera natural en diversas reacciones anaeróbicas del metabolismo. El ganado, las reacciones de putrefacción y la digestión de las termitas forma metano en grandes cantidades, también se desprende del gas natural, del que es un componente mayoritario y en algunas combustiones; también en los procesos de origen humano, hasta constituir cerca del 50 % del emitido a la atmósfera. Desaparece de la atmósfera reaccionando principalmente con los radicales OH, formando entre otros compuestos, al ozono. Su vida media en la troposfera es de 5 a 10 años. Se considera que no produce daños en la salud, pero influye de manera significativa en el efecto invernadero y también en las reacciones estratosféricas (Echarri, 1998).

El **CO₂** y el **CH₄** son generados por la producción de energéticos, la explotación del carbono, las fugas de gas, así como los rellenos sanitarios.

Producen efectos secundarios por adelgazamiento de la capa de ozono, y como consecuencia de esto, cáncer en la piel (Figuerola, 2001).

Según las estimaciones realizadas en el Instituto de Meteorología y Astronomía de la Universidad de Guadalajara, el 63.8 % de **monóxido de carbono (CO)** fue emitido por el transporte (vehículos: 59.0 %, aviones: 2.4 %, ferrocarriles: 0.1 % y otro tipo de transporte motorizado: 2.3 %), mientras que el 19.3 % de emisiones de CO las causaron fuentes fijas tipo combustión de productos energéticos en las plantas estacionarias y 16.9 % de CO se emitió a la atmósfera de cualquier otra clase de origen natural o antrópico (incendios forestales, quema agrícola, etc.). (Davydova et al, 1999).

ÓXIDOS DE AZUFRE:

Incluyen el dióxido de azufre (SO₂), y el trióxido de azufre (SO₃).

• Dióxido de Azufre (SO₂).

Importante contaminante primario, es un gas incoloro y no inflamable, de olor fuerte e irritante. Su vida media en la atmósfera es corta, de unos 2 a 4 días. Casi la mitad vuelve a depositarse en la superficie ya sea húmedo o seco y el resto se convierte en iones sulfato (SO₄)²⁻ convirtiéndose así en un importante factor en la lluvia ácida. (Echarri, 1998).

Lo producen las plantas eléctricas de carbón, los calentadores industriales, la calefacción doméstica, los incineradores de basura, los vehículos que trabajan con diesel y la industria papelera.

Su presencia en la atmósfera aumenta el número de ataques asmáticos, produce deficiencia respiratoria y tos (Figueroa, 2001).

Trióxido de azufre (SO₃).

Contaminante secundario que se forma cuando el SO₂ reacciona con el oxígeno en la atmósfera, posteriormente este gas reacciona con el agua formando ácido sulfúrico con lo que contribuye de forma muy importante a la lluvia ácida y produce daños importantes en la salud, la reproducción de los peces y anfibios, la corrosión de metales y la destrucción de monumentos y construcciones de piedra (Echarri, 1998).

Específicamente, las emisiones de **óxido de azufre (SO, SO₂)** por las fuentes fijas se dan por procesos de combustión de productos energéticos en 73.5 %, por procesos industriales en 22 %, por transporte en 2.4 % y el resto, 2.1 %, es de cualquier otro tipo de origen natural o artificial (Figueroa, 2001).

Óxidos de Nitrógeno:

Incluyen el óxido nítrico (NO), el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el óxido nitroso (N₂O) .

El óxido nítrico y el dióxido de nitrógeno se suelen considerar en conjunto con la denominación de NOx.

Son contaminantes primarios de mucha trascendencia en los problemas de contaminación. El emitido en mayor cantidad es el NO, pero sufre una rápida oxidación a NO₂, siendo este el que predomina en la atmósfera. NOx tiene una vida corta y se oxida rápidamente a NO₃⁻ en forma de aerosol o a HNO₃ (ácido nítrico). Tiene gran trascendencia en la formación del smog fotoquímico, del nitrato de peroxiacetilo e influye en las reacciones de formación y destrucción del ozono, tanto troposférico como estratosférico, así como en el fenómeno de la lluvia ácida. En concentraciones altas, produce daños a la salud y a las plantas y corroe tejidos y materiales diversos. Las actividades humanas que lo producen, son, principalmente, las combustiones realizadas a muy altas temperaturas (Echarri, 1998).

En general, son producidos por generadores de energía, combustión de carbón, aceite y gas, incineradores de basura y vehículos automotores. Propician el desarrollo de asma, irritan los pulmones, causan bronquitis y neumonía (Figueroa, 2001).

La contaminación atmosférica por **óxidos de nitrógeno (NO, NO₂)**, se debe a las emisiones de fuentes fijas, en 48.5 % por la combustión de los productos energéticos, en 3.9 % por procesos industriales y en 39.3 % por el transporte, del que los vehículos motorizados de gasolina y diesel provocaron hasta 32 % y 2.9 % respectivamente; los ferrocarriles produjeron 1.9 % y otros transportes motorizados hasta 2.5 %. El resto de 8.3 % de óxidos de nitrógeno se emite por cualquier otra fuente de contaminación (incendios forestales, quema agrícola, etc. (Davydova *et al*, 1999).

Aerosoles y partículas:

En la atmósfera permanecen suspendidas sustancias muy diversas, como partículas de polvo, polen, hollín (carbón), metales (plomo, cadmio), asbesto, sales, pequeñas gotas de ácido sulfúrico, dioxinas, pesticidas, etc. Se suele usar la palabra **aerosol** para referirse a los materiales muy pequeños, sólidos o líquidos. **Partículas** se les llama a los sólidos que forman parte del aerosol, mientras que se le llama **polvo** a la materia sólida de tamaño un poco mayor (de 20 micras o más). El polvo puede ser un problema local, mientras que los aerosoles son transportados a muy grandes distancias. Según su tamaño pueden permanecer suspendidas en la atmósfera desde uno o dos días, como en el caso de las de 10 micras o más; las más pequeñas hasta varios días o semanas. Algunas de estas partículas son especialmente tóxicas para los humanos, y en la práctica, los principales riesgos para la salud humana por la contaminación del aire provienen de este tipo de polución, especialmente abundante en las ciudades (Echarri, 1998).

Partículas sólidas respirables (PM₁₀).

Partículas de tamaño de alrededor de 10 micras de diámetro, que pueden ser partículas de polvo aun menores de 20 micras, humo, presentes en las estaciones eléctricas de carbón, calefactores domésticos, motores que utilizan diesel, obras en construcción, minería, manufactura de cemento.

Al respirarlas se sedimentan en los pulmones y causan alteraciones respiratorias. (Figueroa, 2001).

El 31.4 % de la emisión de **partículas suspendidas totales (PST)** es debida a la combustión de productos energéticos, 26.4 % a los procesos industriales, 4.3 % al transporte, 3.9 % a la eliminación de desechos sólidos y 33.9 % a fuentes diversas (García, 1997, Davydova *et al*, 1999).

Oxidantes: Ozono (O₃), ozono estratosférico, ozono troposférico.

OZONO (O₃):

Es el principal oxidante en la atmósfera, es un gas de color azulado, que tiene un fuerte olor muy característico que se suele notar después de las descargas eléctricas de las tormentas. Es una sustancia que cumple dos papeles totalmente distintos según se encuentre en la estratósfera o en la troposfera.

Ozono estratosférico.

Es el que está en la estratósfera (10 a 50 Km.), es imprescindible para que la vida se mantenga en la superficie del planeta porque absorbe las letales radiaciones ultravioletas que nos llegan del sol.

Ozono troposférico.

Es el que se encuentra en la troposfera, junto a la superficie de la tierra, es un importante contaminante secundario que se forma por reacciones inducidas por la luz solar en la que participan, principalmente, los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos presentes en el aire. Es el componente más dañino del smog fotoquímico (Echarri, 1998).

El ozono se forma a partir de la reacción química, catalizada por la luz solar, entre el oxígeno molecular y el atómico, es decir, el ozono es un contaminante fotoquímico secundario que se forma como consecuencia de la aparición en la atmósfera de oxidantes originados al reaccionar los óxidos de nitrógeno, los hidrocarburos y el oxígeno en presencia de fuerte radiación solar y altas temperaturas (Brimblecombe 1986, Davydova *et al*, 1999).

Aunque es muy beneficioso en la estratósfera, no es conveniente en superficie cuando su concentración es muy elevada. Irrita las mucosas del sistema respiratorio, causa tos, afecta

la función pulmonar, reduce la resistencia de la gripe y neumonía. Puede agravar los problemas cardíacos crónicos y producir asma, bronquitis y enfisema (Figueroa, 2001).

OTROS CONTAMINANTES:

Microcontaminantes Tóxicos:

Son compuestos orgánicos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlорados y dioxinas. Son moléculas que se caracterizan por ser muy estables químicamente y por lo tanto de muy difícil destrucción. Permanecen en los ecosistemas por años y algunas de estas sustancias se acumulan en la cadena trófica (Echarri, 1998).

Los producen los incineradores de basura y por la combustión del carbono.

Son agentes causales de cáncer, además de que generan problemas reproductivos y malformaciones fetales. (Figueroa, 2001).

Metales Tóxicos:

Los metales pesados son un grupo de elementos caracterizados por poseer propiedades metálicas y una densidad superior a 5. Aunque en este grupo se incluyen varios elementos esenciales para el crecimiento, reproducción y/o supervivencia de los organismos vivos, otros muchos con gran importancia económica e industrial pueden ocasionar efectos perjudiciales.

Definir los principales metales tóxicos no es fácil. La Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (E.P.A.) ha definido al **berilio** (un metal traza ligero) y al **mercurio** (un metal traza pesado) como peligrosos, lo cual significa que una ligera exposición a los mismos puede causar daños a la salud humana. Otros nueve metales han sido definidos como posibles elementos peligrosos, lo cual significa que su peligrosidad es potencial y que deben mantenerse bajo control. Son el **bario**, el **cadmio**, el **cobre**, el **plomo**, el **manganeso**, el **níquel**, el **cinc**, el **vanadio** y el **estaño**. Todos éstos, excepto el **manganeso** son metales traza, y todos, excepto el **bario**, son metales pesados (Duffus, 1983).

El medio ambiente recibe aportes de metales de origen tanto natural como artificial. Son procesos naturales que aportan metales al ambiente, fenómenos geológicos normales como la formación de menas, la meteorización y erosión de las rocas, la lixiviación y los fenómenos volcánicos en el fondo marino. Los aportes de origen artificial son consecuencia

de la actividad humana, la mayoría procedentes de procesos desarrollados en la minería y en la industria.

Los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con muy diversos tipos de moléculas orgánicas. Los procesos de bioacumulación son debidos básicamente a la imposibilidad, por parte del organismo afectado, de mantener los niveles necesarios de excreción del contaminante, por lo que sufre una retención en el interior del mismo. El proceso se agrava a lo largo de las cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes. Una vez incorporados a los tejidos, los metales son capaces de reaccionar con una gran variedad de sustancias. Sus efectos tóxicos específicos sobre un sistema biológico, sin embargo, dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para la función normal de ese sistema. Así, los metales muestran gran afinidad por grupos sulfhidrilo y, en menor medida, por radicales amino, fosfato, carboxilo, imidazol e hidroxilo, pertenecientes a enzimas y otras proteínas esenciales. Los ácidos nucleicos también resultan afectados por los metales pesados. Éstos ocasionan un efecto genotóxico que puede ser catalogado en las siguientes categorías: (a) mutaciones genéticas; (b) aberraciones cromosómicas; (c) alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos; y (d) transformaciones celulares.

Hay similitudes concretas en la toxicidad de ciertos metales. Así, aunque las proteínas particulares que son principalmente afectadas por **mercurio, plomo, cadmio y arsénico** pueden diferir de un metal a otro, una interacción bioquímica similar es la responsable de la toxicidad de estos cuatro metales (Laws, 1981).

Mercurio, plomo y cadmio se encuentran entre los metales más prevalentes en el medio ambiente. Todas las formas de mercurio son potencialmente tóxicas, pero el rango de toxicidad varía considerablemente, siendo el vapor de mercurio la forma más peligrosa, dado que puede difundir a través de los pulmones hasta la sangre y luego hasta el cerebro, donde puede causar daños importantes. Además, al evaluar el riesgo debido al mercurio en un ambiente determinado, hay que tener en cuenta las transformaciones que puede sufrir. Probablemente la más grave de éstas sea la transformación del mercurio metálico en metil- y dimetil-derivados por la acción de microorganismos anaeróbicos, especialmente, *Clostridium cochlearum*, en los sedimentos acuáticos.

El **cadmio** se emplea industrialmente como agente antifricción, antioxidante, en aleaciones, en los semiconductores, baterías y en la manufactura de PVC. En el ambiente, el cadmio es peligroso porque muchas plantas y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran dentro de sus tejidos. Una vez absorbido, se combina con la proteína metalotioneína y se acumula en los riñones, el hígado y los órganos reproductores.

El **plomo** está ampliamente distribuido en la naturaleza, pero normalmente el riesgo máximo surge de las emisiones asociadas al uso humano del metal y de sus derivados. Los humos y el polvo proceden de la fundición de plomo, de la fabricación de insecticidas, pinturas, vidrios, y de las gasolinas que contienen aditivos de plomo. Los animales pueden absorber plomo por inhalación o ingestión. Si la absorción es lenta, la excreción lo es más aún, de manera que el plomo tiende a acumularse. La anemia es el primer síntoma de envenenamiento crónico producido por el plomo en los animales, dado que interfiere en la síntesis del grupo hemo, reflejándose en síntomas tales como náuseas, vómitos y dolores abdominales. Más grave es la degeneración del tejido en el sistema nervioso central (Codina y Pérez, 1993).

Muchos de los metales tóxicos están presentes en las emisiones de los escapes de vehículos automotores, incineradores de basura, combustión de aceite y carbón, manufactura de baterías, cemento y producción de fertilizantes. Provocan efectos en los sistemas circulatorio, respiratorio, nervioso y en los riñones. Generan también problemas de hiperactividad y de aprendizaje en los niños. Pueden acumularse en los huesos y tejidos (Figuerola, 2001).

En resumen, el transporte vehicular **de la ciudad de Guadalajara** aporta hasta 75 % de la contaminación atmosférica en nuestra ciudad, constituida principalmente por monóxido de carbono, y óxidos de nitrógeno.

La industria contribuye en casi 20 % con bióxidos de azufre, partículas suspendidas y algunos óxidos de nitrógeno.

El ozono es un contaminante de cuidado, que requiere para su formación de una atmósfera "sucia", donde se acumulan óxidos de nitrógeno, y monóxido de carbono, es decir, los gases oxidantes, así como altas temperaturas que garanticen una alta

concentración de radiación solar. Así, se produce ozono aproximadamente dos horas después de la máxima temperatura que se registra durante el día. (Davydova, 2001).

D).- Acerca de LAS CITOCINAS MARCADORAS DE INFLAMACIÓN en la RESPUESTA INMUNE.

Las citocinas son proteínas solubles o glicoproteínas producidas por los leucocitos y otros tipos de células que sirven como señales químicas de comunicación de una célula a otra y actúan en el sistema inmune como moduladores de respuestas biológicas. Las citocinas son usualmente secretadas, aunque algunas pueden ser expresadas sobre una membrana celular o mantenidas en reservorios en la matriz extracelular. Las citocinas se unen con receptores de superficie sobre las células blanco que están ligadas a señales de transducción intracelulares y a vías de segundos mensajeros. Sus efectos pueden ser autócrinos, actuando sobre las mismas células que las producen, o parácrinos actuando sobre células vecinas y sólo raramente endócrinos, actuando sobre células distantes.

Las interleucinas son un grupo de citocinas sintetizadas por linfocitos, monocitos y otras células específicas que promueven el desarrollo de células T, células B, células troncales hematopoiéticas y tienen varias otras funciones biológicas. Incluyen desde la interleucina-1 (IL-1) hasta la IL-17. Las monocinas son proteínas sintetizadas por los macrófagos (Cruse and Lewis, 1999).

Enseguida se revisan solamente las interleucinas y monocinas que tienen una función importante como mediadoras de respuesta inflamatoria en el sistema inmune y que además se sabe que aumentan su síntesis cuando los individuos se exponen a altos niveles de contaminantes atmosféricos.

INTERLEUCINA 6 (IL-6)

La interleucina 6 (IL-6) humana es una citocina de 26 kD, y en su forma precursora es una cadena polipeptídica de 212 a.a. y en su forma madura es de 184 a.a. con una terminal amínica glicosilada (Heney y Whieher 1995). Es producida por células endoteliales, fagocitos mononucleares, fibroblastos, linfocitos T activados, varios neoplasmas tales como mixomas cardiacos, células de cáncer de vejiga y de cáncer cervical. Es secretada en respuesta a otras citocinas, la IL-1 y el TNF (factor de necrosis tumoral), sus principales acciones las efectúa sobre los hepatocitos y las células B (Cruse *and* Lewis, 1999).

La IL-6 fue descrita inicialmente como un producto de secreción de los fibroblastos y nombrado $FN\beta$ -2. Mas tarde, fue conocido como un factor estimulante de las células B (BSF-2), reflejado por su capacidad para inducir la diferenciación de las células B a través de la secreción de Inmunoglobulinas (Mak *and* Simard, 1998).

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina proinflamatoria que es normalmente bien regulada y expresada en bajos niveles , excepto durante infección, trauma u otros estados de estrés. Entre varios factores que la regulan de manera negativa están las hormonas como los estrógenos y la testosterona. Después de la menopausia y la andropausia los niveles de IL-6 están aumentados aún en ausencia de infección, trauma o estrés. La IL-6 es un potente mediador de la inflamación, y ha sido propuesto que algunos cambios clínicos importantes relacionados con la edad, tales como los que caracterizan a las enfermedades inflamatorias crónicas, como la osteopenia, decremento en la masa ósea, bajo grado de anemia, decremento de albúmina en el suero, incremento de Proteína C reactiva en suero, etc. sean debidos a una inapropiada y aumentada presencia de IL-6 (Eirshler *and* Sëller, 2000).

Bajo una estimulación adecuada, la IL-6 es producida por muchos tipos celulares, y también es producida durante el desarrollo embrionario del ratón, aunque ahí su función es desconocida. La IL-6 provee una señal accesoria o coestimuladora para las células T, quizá para la regulación de la expresión del receptor de la IL-2 (RIL-2). La IL-6 también aumenta la actividad de las células NK (Natural Killer). Los ratones deficientes de IL-6 tienen un

50% de reducción en el número de timocitos y un reducido número de células T maduras en la periferia. La deficiencia de IL-6 también resulta en un menor número de células progenitoras granulocíticas-monocíticas, megacariocíticas y linajes eritroides, comparados con animales de tipo silvestre. Aunque la IL-6 no parece ser requerida para el desarrollo normal de células B y la regulación de los genes específicos en el ratón, los ratones inmunizados fallan en la generación de niveles totales normales de IgG y son casi completamente deficientes para los isotipos IgG2a, IgG2b y IgG3.

Quizá la acción más dramática de la IL-6 es la inducción de síntesis y secreción de proteínas proinflamatorias en los hepatocitos. **IL-6 es el más potente regulador de proteínas de fase aguda conocido**, induce elevados niveles séricos de fibrinógeno, de proteína C reactiva, de α_1 -antitripsina, de α_1 -antiquimiotripsina, haptoglobulinas, reducidos niveles de albúmina, fibronectina y transferrina. La IL-6 también tiene una función importante en la regulación de la actividad de los neutrófilos (Mak y Simard, 1998). Investigaciones sobre la función de la IL-6 *in vivo* han demostrado su papel principal en varios fenómenos que incluyen además de la inducción de la respuesta de fase aguda, desórdenes autoinmunes relacionadas con la activación policlonal de células B, como en el caso del Lupus Eritematoso Sistémico, donde se ha visto que la IL-6 y la IL-10 son factores clave en la regulación de la actividad de las células B secretoras de autoanticuerpos del Lupus (Cross y Benton, 1999). También en neoplasmas linfoides, en la maduración de los megacariocitos y el desarrollo de plasmacitosis, así como también está asociada a altos niveles de IgG1. La IL-6 puede ser inducida por una gran variedad de agentes, incluyendo: LPS, IL-1, TNF, IFN β , ionóforos de calcio, combinaciones de lectinas mitogénicas y ésteres de forbol y virus (Heney *and* Whicher 1995).

En resumen, se puede decir que el rango de actividades de la IL-6 incluye tanto la inhibición como la promoción del desarrollo celular, la regulación de la expresión de los genes de proteínas de fase aguda y la inducción de la diferenciación celular.

Las dos funciones *in vivo* de la IL-6 son reportadas como:

Principal: La IL-6 actúa como un factor de desarrollo de algunas células no malignas y malignas, tales como las células plasmáticas malignas en el mieloma múltiple, células mesangiales en el riñón y heratinocitos.

Secundaria: La IL-6 media las respuestas inmune e inflamatoria en artritis reumatoide, enfermedad de Castleman, psoriasis, mixoma cardíaco, caquexia y otras condiciones inflamatorias (Ogata *et al*, 1999).

Las actividades biológicas de la IL-6 son multifuncionales e incluyen, efectivamente, la estimulación de la proliferación de células B, la producción de inmunoglobulinas, la iniciación de la respuesta de fase aguda; sin embargo, también se sabe que la IL-6 además, afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) al activar al eje hipotálamo-pituitario-adrenocortical e incrementa el metabolismo del triptófano y la serotonina cerebral. **La IL-6 ha sido propuesta como un importante mediador de la interacción entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino.** Los efectos centrales y periféricos de la IL-6 son presumiblemente mediados a través de su receptor de membrana (IL-6R). Los RNAm tanto de la IL-6 como de IL-6R han sido detectados en varias regiones del cerebro. También la expresión de la IL-6 en el cerebro ha sido observada en varios desórdenes del SNC, algunos de los cuales han sido asociados con alteraciones en el metabolismo de la serotonina. Se ha propuesto que las interacciones entre IL-6 y la serotonina cerebral son un proceso complejo que involucra al factor liberador de corticotropina y a los péptidos opioides. Es comúnmente sabido que los mecanismos moleculares que rigen las acciones de IL-6 sobre el eje hipotálamo-pituitario-adrenocortical y sus otras funciones cerebrales involucran los efectos integrados del glutamato, del Ca^{2+} y del $3'5'$ -AMP cíclico, de la protein cinasa C y de otras vías metabólicas (Barkhudaryan *and* Dunn, 1999).

Así mismo, se han encontrado altos niveles de IL-6 en el tejido cerebral o en el fluido cerebro-espinal en varios desórdenes del SNC como el mal de Alzheimer, la esclerosis múltiple, el mal de Parkinson, en daño cerebral por traumatismo, en tumores cerebrales y en infecciones del SNC, y en todas ellas, también se ha encontrado IL-6 en sangre, mostrando que las condiciones del cerebro pueden generar una determinada respuesta inmune, concluyéndose a partir de varias líneas de investigación, que el cerebro modula significativamente la producción periférica de IL-6, a través de : (i) estímulos inflamatorios centrales inducen eficientemente la producción de IL-6 periférica; (ii) los opioides centrales

son efectivos moduladores de la IL-6 periférica y (iii) el sistema nervioso simpático representa una vía inhibitoria para la IL-6 periférica (Terreni *and* De Simoni, 1998).

Recientemente un anticuerpo anti receptor IL-6 ha sido desarrollado, con la función de neutralizar la actividad de IL-6 humana, constituyéndose como una propuesta de terapia para las enfermedades relacionadas con la IL-6, tales como el mieloma múltiple, la enfermedad de Castleman y la Artritis Reumatoide (Ogata *et al*, 1999).

También se ha propuesto que la **interleucina-6** juega un papel clave en varios mecanismos que contribuyen a desarrollar la enfermedad coronaria cardíaca, se han encontrado muchas evidencias de que la inflamación tiene una función importante en el desarrollo de esta enfermedad. Se ha ligado la presencia de infecciones en la pared de los vasos con arteriosclerosis y también los datos epidemiológicos implican infección en sitios remotos en la etiología de la enfermedad coronaria cardíaca. La IL-6 es un potente inductor de respuesta de fase aguda hepática. Elevadas concentraciones de proteínas de fase aguda, tales como la Proteína C Reactiva (PCR) son encontradas en pacientes con síndromes coronarios agudos, y pueden predecir riesgos futuros en individuos aparentemente sanos. La reacción de fase aguda es asociada con elevados niveles de fibrinógeno, un fuerte factor de riesgo para la enfermedad coronaria cardíaca, con autócrina y parácrina activación de monocitos por la IL-6 en la pared de los vasos sanguíneo, contribuyendo a los depósitos de fibrinógeno. La respuesta de fase aguda está asociada con un incremento en la viscosidad sanguínea, aumento en la actividad y el número de plaquetas (MacCarthy, 1999). Las citocinas IL-1 y el TNF- α inducen la liberación de IL-6 de varios tipos de células, incluyendo las células de músculo liso. Durante el daño vascular, éstas células son expuestas a las plaquetas o a sus productos y la producción de citocinas por las células de músculo liso contribuyen al daño vascular. Además, la IL-6 circulante estimula el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, cuya activación es asociada con la obesidad central, la hipertensión y la resistencia a la insulina (Yudkin *et al*, 1999).

Actualmente se ha considerado que la elevada expresión de la IL-6 puede ser un marcador de malignidad en gliomas humanos. Los glioblastomas multiformes crecen

rápida y son altamente resistentes al tratamiento, comparados con otros tipos y grados de gliomas, así que es de gran interés identificar marcadores de agresividad en estos tumores, con lo cual podrían mejorarse las medidas terapéuticas. La IL-6 es frecuentemente producida en gliomas y su expresión puede estar involucrada en el desarrollo celular, en la resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia (a través de una vía antiapoptótica), y en la angiogénesis. Se hicieron investigaciones para estudiar la relación entre el nivel de expresión de genes de IL-6 a través de la reacción de la polimerasa en cadena y varios tipos y grados de gliomas. Se encontró que en el glioblastoma multiforme se mostraron niveles significativamente más elevados de expresión de IL-6 con respecto de otros tipos de gliomas. Encontrando además que la IL-6 fue producida principalmente por células malignas y por una pequeña cantidad de células endoteliales vasculares. Puede ser inferido entonces, que la expresión del gene de la IL-6 está relacionado con la agresividad del glioma y que la IL-6 además tiene un papel central en la conducta del glioblastoma multiforme (Rohhion *et al*, 2001).

Receptor:

El receptor de la IL-6 (IL-6R) es una molécula de 80 kDa, ligando específico de la IL-6 que está unido a la cadena α y a la cadena de 130 kDa, que son requeridos para las señales de transducción pero no tienen afinidad detectada para IL-6. El IL-6R α contiene una membrana proximal que caracteriza a su familia de receptores. La unión de la IL-6 al IL-6R α estimula la dimerización ligada a disulfuro con gp130, e inicia la actividad de la fosforilación de tirosina. Aunque no parecen unirse a gp130, dos regiones de IL-6 parecen importantes en la especificidad de gp130. gp130 es expresada en la mayoría de las células de tejidos y es un componente del receptor común encontrado en oncostatina M (OSM), Factor Neutrofílico Ciliar (CNTF), Factor Inhibidor de Leucemia, y complejos receptores de IL-11. El IL-6R α tiene una distribución más limitada, siendo restringido a PBMC, células T maduras, y activadas, placas de Peyer y células B. Para facilitar la función de la IL-6 en las respuestas de fase aguda, el receptor es también expresado en los hepatocitos. Tanto los humanos como los ratones, expresan una forma soluble de IL-6R α , la cual conserva su capacidad para unirse a IL-6 y liberar señales a través de gp130. (Mak *and* Simard, 1998).

INTERLEUCINA 1 (IL-1)

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina sintetizada por fagocitos mononucleares activados que han sido estimulados por ribopolisacáridos o por interacción con linfocitos CD4+. Es una monocina y es un mediador de la inflamación. Comparte muchas propiedades con el factor de necrosis tumoral.

La IL-1 está compuesta de dos principales polipéptidos de 17 kD cada uno, con puntos isoeléctricos de 5.0 y 7.0 y son designadas IL-1 α y IL-1 β respectivamente. Tienen las mismas actividades biológicas y se unen al mismo receptor sobre las superficies celulares. La IL-1 α actúa como una sustancia asociada a la membrana y la IL-1 β es encontrada libre en circulación (Cruse *and* Lewis, 1999).

La actividad de la IL-1 está representada por sus dos glicoproteínas separadas, la IL-1 α , y la IL-1 β , que son transcritas de dos genes diferentes. Los genes para la IL-1 α humana, la IL-1 β y la IL-1ra (receptor antagonista de la IL-1) además de los receptores IL-1R1 y IL-1R2 ocupan una porción de DNA en el brazo largo del cromosoma 2 humano. Las más conocidas actividades biológicas de la IL-1 son comunes a la isoforma ácida IL-1 α y la isoforma neutra IL-1 β .

Existen numerosas funciones para la IL-1. La IL-1 α es expresada en el timo y soporta la maduración y el desarrollo de los timocitos y es un potente regulador de las moléculas de adhesión endoteliales, induciendo la expresión de P-selectina, E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. La IL-1 es secretada por las células progenitoras en división CD34⁺, CD45RA^{lo}, CD71^{lo} del cordón umbilical humano y tiene una función importante en la hematopoyesis por la inducción de factores de crecimiento tales como G-CSF, e IL-3. También estimula la hematopoyesis después de radiaciones o drogas mielobláticas, aunque bloquea la producción eritroide por interferencia con la formación CFU-E.

La IL-1 puede, a veces, estar involucrada en la exacerbación y patogénesis de la enfermedad. Una función de la IL-1 en enfermedades de la piel y la hipersensibilidad ha sido promovida, de acuerdo con las recientes observaciones sobre los ratones deficientes en IL-1 β que tienen muy dañada su hipersensibilidad. Niveles elevados de IL-1 han sido

observados durante desórdenes hematológicos malignos, en esclerosis sistémica, en artritis reumatoide, durante la enfermedad del injerto contra el huésped (Mak *and* Simard, 1998).

Se ha establecido recientemente una relación entre la IL-1beta, la nicotina del humo del tabaco y el síndrome de muerte infantil repentino (SMIR). La exposición a los constituyentes del humo del cigarro materno tanto prenatal como postnatal está indicado como un importante factor de riesgo en el SMIR, aunque se desconoce el mecanismo de la muerte atribuible a la nicotina. La alimentación materna hacia el bebé de madres fumadoras tiene aún un riesgo mayor ya que la concentración de la nicotina en la leche materna es aún mayor que en el plasma sanguíneo en 2.9 veces más. Se ha observado que algunas víctimas de SMIR tienen infecciones leves y un sistema inmune muy predispuesto antes de su muerte, lo que ocasiona liberación de citocinas como la IL-1 β que pueden deprimir la respiración. Debido a que las apneas en la infancia están asociadas al SMIR, se ha probado la hipótesis de que la exposición postnatal a los constituyentes del tabaco y las infecciones podrían afectar adversamente la capacidad de los niños para hacer frente a los episodios apnéicos. Esto fue desarrollado por la investigación de los efectos agudos de la nicotina y la IL-1beta sobre la apnea por estimulación refleja de la laringe y de la subsecuente autoresucitación (Froen *et al*, 2000).

También ahora se ha observado que la IL-1beta tiene efectos vasodilatadores en la vascularización cerebral. Se ha probado que la administración central de IL-1beta incrementa el flujo sanguíneo cerebral y la temperatura corporal, en parte a través de la producción de prostaglandinas, teorizando que este incremento en el flujo sanguíneo cerebral ocurre antes de cualquier cambio en el cerebro o en la temperatura corporal y que los efectos termoregulatorios o cerebrovasculares de la IL-1beta podrían ser atenuados por la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO). Basados en los hallazgos en modelos animales, se sugiere que los efectos vasodilatadores de la IL-1beta en la vascularización cerebral son independientes de la temperatura y que el óxido nítrico juega un papel principal tanto en los efectos termoregulatorios como en los cerebrovasculares de la IL-1beta administrada en el sistema nervioso central (Monroy *et al*, 2001).

La IL-1 también tiene un receptor antagonista, **IL-1ra**, definido por no tener otra función conocida más que unirse a los receptores IL-1 en ausencia de alguna señal transductora de actividad. Sin embargo, para un bloqueo completo de la función de la IL-1, IL-1ra debe estar presente en una concentración determinada. De este modo, parece más bien, que la función de la IL-1ra *in vivo*, es más comúnmente modular la actividad de la IL-1, antes que inhibirla. IL-1ra puede en parte, regular la hematopoiesis (Mak *and* Simard, 1998).

El sistema IL-1 es un principal regulador de las interacciones celulares locales durante la implantación embrionaria. Debido a que la IL-1beta y el receptor antagonista IL-1ra están expresados en endometrio humano, recientemente se ha considerado que una relación apropiada de IL-1beta y de IL-1ra podría favorecer el proceso de la implantación embrionaria. Después de las investigaciones realizadas se concluyó que la IL-1 efectivamente podría jugar un papel crucial en la interacción materno-embriónica por la regulación de la expresión de IL-1beta y de IL-1ra por las células estromales resultando en una relación apropiada durante el proceso de implantación embrionaria (Huang *et al*, 2001).

Receptor: El receptor 1 (IL-1R1) es una glicoproteína de 80 KDa que solamente media los efectos biológicos de IL-1, uniéndose a la IL-1 α y a la IL-1 β . Los receptores son expresados sobre la mayoría de las células y pueden ser disparados fisiológicamente para inducir señales relevantes con la unión de tan solo 10 moléculas de IL-1 sobre la superficie celular. La unión de IL-1 a IL-1R1 resulta en la formación de un complejo de alta afinidad (IL-1R-AcP) que incluye una proteína accesoria transmembranal (AcP). La IL-1 se une a un receptor adicional: IL-1R2, una proteína de 68 KDa expresada sobre las células epiteliales y sobre linajes hematopoiéticos, incluyendo células B. Interesantemente la IL-1R2 no tiene función en el señalamiento y existe meramente como un receptor señuelo que puede secuestrar IL-1 sobre la membrana o ser secretado y unir a la IL-1 soluble. El virus de la viruela de las vacas codifica un gen IL-1R2, el cual ellos expresan dentro de células infectadas, ostensiblemente para reducir la fuerza de la continuidad de la IL-1 mediadora de respuestas inflamatorias. La IL-1 inductora de señales involucra la activación de NF-kappa B en una gran variedad de células, incluyendo a las células T. En común con otras

citocinas, la IL-1 parece estar involucrada en la cascada de la kinasa JAK-STAT. Algunos factores de transcripción han sido identificados por ser activados y /o sobrerregulados por la IL-1, tales como C/EBP, EGR-1, FOS, JUN, MYB, MYC y NFIL6. (Mak *and* Simard, 1998)

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL alfa (TNF α)

La familia de TNF contiene dos citocinas relacionadas, TNF α y TNF β , que muestran actividades que se translanan sobre una gran variedad de sistemas biológicos. El TNF α es un pirógeno endógeno y un factor citotóxico que juega un papel central en la regulación de la inflamación, la inmunidad y la defensa del huésped. La rápida producción de esta potente citocina en respuesta a infecciones microbianas puede provocar tanto efectos benéficos locales y efectos letales sistémicos, señalando la naturaleza dual de TNF α (Heney *and* Whicher, 1995).

TNF α es una proteína glicosilada compuesta de 157 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 17 kDa. TNF α es sintetizado como un péptido de 26 kDa y es procesado por la remoción de un péptido señal de 76 aminoácidos. El TNF α biológicamente activo ocurre como un trímero en solución. Los genes que codifican para el TNF- α y TNF- β (linfotoxinas) están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en la región MHC del hombre (Cruse *and* Lewis, 1999).

TNF tiene dos distintos receptores que han sido identificados: El de tipo I [p55] es una proteína de 55 a 60 kDa y el de tipo II [p75] es una proteína de 75-80 kDa, los cuales, a pesar de la ausencia de homología extracelular, pueden unir a TNF α y TNF β con rangos de afinidad de $1-10 \times 10^{-10}$ M.

Los receptores TNF son expresados por virtualmente todas las células de los mamíferos, con excepción de los eritrocitos. La densidad de superficie celular del receptor tiene un rango de 2000 a 50000 sitios por célula.

El TNF α puede ser inducido por un amplio rango de agentes, incluyendo: bacterias, virus, parásitos, LPSs, *S. Aureus*, IL-1, IL-2, TNF, IFN, GM-CSF, PAF, C5a, sustancia P, anticuerpos anti TCR, células tumorales, ésteres de forbol, indometacina y zimoan. Los

agentes que suprimen la producción de $\text{TNF}\alpha$ incluyen: dexametasona, ciclosporina A, PGE_2 , IL-4, IL-10, $\text{TGF}\beta$, lipoxigenasas inhibitoras, receptores antagonistas PAF y vitamina D_3 .

Más que cualquier otra citocina, con la excepción de la IL-1, el TNF ha mostrado su participación en los procesos fisiopatológicos de numerosas enfermedades crónicas y agudas. El desarrollo de antagonistas TNF, incluyendo el TNFR soluble y anticuerpos anti TNF pueden llegar a ser efectivos en las terapias para el manejo de choque séptico y otras enfermedades inflamatorias (Heney and Whicher, 1995).

El TNF fue primero identificado por su capacidad (como su nombre lo indica) para inducir necrosis hemorrágica de tumores en ratones. TNF o $\text{TNF}\alpha$ tiene muchas actividades biológicas encubiertas y está estrechamente ligado al gen para la linfotoxina α ($\text{LT}\alpha$), también conocido como $\text{TNF}\beta$, los cuales están localizados en las regiones HLA y MHC de humanos y ratones, respectivamente. Las moléculas de TNF son sintetizadas como pre-proteínas de 226 aminoácidos que son proteolíticamente procesados para producir subunidades maduras de 157 aminoácidos que se ensamblan dentro de complejos homotriméricos. El TNF también puede existir como una glicoproteína de superficie transmembranal y ser capaz de liberar señales diferenciales, comparada con la forma soluble, a través del receptor TNF.

La lista de células que secretan TNF es grande, incluyendo una variedad de células hematopoiéticas tales como células T y B, células NK, granulocitos, mastocitos, astrositos, células epidermales, hepatocitos, fibroblastos, células de músculo liso y células ováricas. Sin embargo, los monocitos y los macrófagos son las fuentes más importantes de TNF. Los mastocitos también secretan grandes cantidades de TNF que almacenan en gránulos, recientemente reportados por jugar un papel crítico en la protección del huésped contra peritonitis bacteriana aguda.

Estas células (mastocitos) también pueden ser una fuente importante de TNF en la facilitación del flujo de neutrófilos y en la mejora de las infecciones por enterobacterias. Las células estromales tímicas producen pequeñas cantidades de TNF que pueden regular la muerte celular y el desarrollo de los timocitos. El TNF también media la muerte celular por apoptosis en células T maduras CD8^+ , reguladas con el sistemas FAS/FASL. La muerte de

tumores específicos por macrófagos y células NK puede estar mediada en parte por TNF, aunque estudios recientes han sugerido una función (*in vivo*) inhibitoria de TNF sobre las células NK de aclaración del tumor.

El TNF ha sido ampliamente conocido por su capacidad para mediar los efectos sistémicos tales como la fiebre, proteínas de respuesta de fase aguda, choque endotóxico y caquexia. Recientes datos sugieren que también puede inducir angiogénesis. La depleción de TNF α o la deficiencia de receptores resulta en susceptibilidad a infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*, lo cual puede reflejar cierta dependencia de TNF en la producción de nitrógeno reactivo en los macrófagos durante la defensa del huésped. Los ratones deficientes de TNFRp55 también tienen un defecto en la infiltración de neutrófilos inducida por TNF, así como en la de células mononucleares dentro de los pulmones, el hígado y los riñones, en concordancia con los niveles reducidos de la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 y E-selectina. Se ha encontrado que el TNF α y la IL-3 se sinergizan para estimular el desarrollo de células dendríticas y de Langerhans de células progenitoras. El TNF también regula la expresión de moléculas de clase I (MHC) sobre células endoteliales, fibroblastos y células neuronales y tiene una actividad antiviral intrínseca. IL-1 induce la expresión de TNF en PBMC y el TNF a su vez induce la regulación de IL-1. Interesantemente, la señalización a través de CD28 parece controlar la síntesis de TNF y los ratones deficientes de la molécula coestimuladora de células T (CD28), no son tan susceptibles a la exotoxina inductora de choque tóxico, aparentemente, como resultado de una pérdida completa de producción de TNF y un 90 % de decremento en la secreción de IFN γ (Mak *and* Simard, 1998).

El TNF-alfa parece estar asociado también a enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer, ya que éstas están también caracterizadas por altos niveles de citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF-alfa en el sistema nervioso central. Ya que los receptores del TNF-alfa y ciertos receptores de factores tróficos como las neurotrofinas comparten un alto grado de homología y son capaces de activar vías de señalización similares, existe la posibilidad de que los niveles alterados de la citosina puedan afectar la función neurotrófica en los ancianos o en enfermedades del sistema nervioso central. Parece ser que las interacciones entre el TNF-alfa y las neurotrofinas pueden alterar la homeostasis neuronal y contribuyen de este modo

a la degeneración neuronal ocurrida durante las enfermedades del sistema nervioso central asociadas con la edad (Macdonald *et al*, 2000).

El TNF-alfa está recientemente relacionado con patologías asociadas con la obesidad, considerándose que la acción anormal del TNF-alfa en los adipositos altera muchos aspectos de la homeostasis metabólica en la obesidad. La resistencia a la insulina es una característica común de la obesidad y predispone a los individuos afectados a una variedad de enfermedades, que incluyen hipertensión, dislipidemias, problemas cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2. Los mecanismos moleculares de estas patologías no están bien entendidos y actualmente se enfoca hacia las citocinas, particularmente al TNF-alfa y a las proteínas unidas a ácidos grasos como sitios potenciales para estudiar las bases moleculares de estos desórdenes. El análisis de los sistemas de experimentaciones con modelos murinos específicos demostraron que la ausencia genética de señalización TNF en la obesidad: (i) mejora significativamente la capacidad de señalización del receptor de insulina y consecuentemente, la sensibilidad a la insulina; (ii) previene la atrofia del tejido adiposo oscuro y la deficiencia del beta 3-adrenoreceptor y mejora las respuestas termoadaptativas, (iii) disminuye la hiperlipidemia y la hiperlipinemia (Hotamisligil, 2000).

Receptor: El TNF α y el LT α comparten los receptores TNFRp55 y el TNFRp75 (CD120b), los cuales son expresados en la mayoría de las células de los humanos y los ratones. La unión de los receptores TNF a cada una de sus moléculas estructuralmente relacionadas, media algunas actividades biológicas similares y se ha sugerido que pueden ser moléculas redundantes. La expresión del receptor TNF es diferencialmente regulada sobre varios tipos de células: células T activadas, reguladas tanto por las proteínas p55 como p75, donde la activación de células B resulta en la regulación de p75, pero no influye en la expresión de p55. Los receptores TNF también existen en forma soluble, y también son secretados de manera diferencial dependiendo del estímulo y el tipo de célula, donde los niveles séricos pueden ser indicativos de respuestas inmunes normales o patológicas. Los receptores solubles aparecen bajo diferentes circunstancias, con la capacidad para potenciar o disminuir la actividad del TNF. A pesar de las evidencias para la función del TNF en el desarrollo tímico y en la apoptosis, los ratones deficientes de receptores TNF,

tienen desarrollo de células T normal. Sin embargo, no sorprende que estos ratones estén protegidos contra choque tóxico. La deficiencia de TNFR resulta en una interrupción en la formación de los centros germinales en los órganos linfoides periféricos.

Las proteínas p55 y p75 son miembros de una gran superfamilia de moléculas TNFR, involucradas en un amplio rango de actividades biológicas, tales como la respuesta de fase aguda, la apoptosis, la activación de linfocitos, y el desarrollo de células tumorales. Al menos parte de la pleiotropía de los TNFRs refleja el hecho de que unen y median los efectos de TNF y LT α . Los homotrímeros LT α . Se unen tanto al TNFR p55 como al TNFR p75, aunque no está claro si los TNFRs pueden mediar señales específicas vía interacciones con TNF o LT α ; sin embargo, las células que expresan un alto ratio de TNFR p75/p55 son insensibles a la LT α , y los altos niveles del receptor p75 parecen inhibir los efectos de LT α (Mak *and* Simard, 1998).

E).- Acerca de las ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE mediadas a través de las CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS como resultado de la EXPOSICIÓN a CONTAMINANTES AMBIENTALES.

Alteraciones producidas por el ozono:

Algunos contaminantes específicos, tales como el ozono, mostraron inducir inflamación neutrofílica de vías respiratorias en humanos voluntarios sanos, en un rango de exposición controlada de 0.10 a 0.4 ppm de ozono, observado tanto en fluido de lavado broncoalveolar (BAL) como en biopsia de mucosa bronquial. El flujo de neutrófilos parece ser máximo entre 1-6 horas de exposición al ozono y persiste hasta las 18 horas. También fué reportado **un incremento en los niveles de varios marcadores de inflamación como la IL-6, PGE₂, leucotrieno B₄, tromboxano B₄, fibronectina, activador de plasminógeno y elastasa en el fluido BAL después de la exposición al ozono.** En estudios donde los datos fueron disponibles 1 hora y 18 hrs. después de la exposición al ozono, los cambios en la IL-6 y la PGE₂ fueron máximos después de una hora de exposición y la fibronectina y el activador de plasminógeno fueron más altos 18 hrs. después de la exposición. Estudios *in*

in vitro de las células epiteliales o de linajes celulares epiteliales han sugerido posibles mecanismos por los cuales el ozono puede inducir la inflamación. Dichas células epiteliales expuestas al ozono generan algunos eicosanoides como los PGE₂, **y las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y la IL-8** y la proteína pro-inflamatoria fibronectina. Las células de epitelio nasal en cultivo responden a altos niveles de ozono (0.5 ppm), generando moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1); la principal molécula de adhesión para los neutrófilos y eosinófilos en las vías respiratorias, **así como las citocinas IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)** (Peden, 1997).

Alteraciones producidas por el SO₂.

En investigaciones que han tenido, tanto estudios clínicos con animales, como con humanos voluntarios que fueron expuestos a contaminantes específicos para evaluar sus efectos en la función pulmonar, se ha sugerido que el efecto de los contaminantes sobre los pulmones, sigue un mecanismo mediado por el sistema nervioso. En los asmáticos, el SO₂ induce broncoespasmos, lo cual se puede revertir con medicamentos [beta] agonistas o anticolinérgicos (Peden, 1997).

Sin embargo, también existen evidencias de alteraciones mediadas inmunológicamente. Algunos desórdenes inmunológicos reportados en la literatura son:

Inflamación inespecífica de los pulmones como consecuencia de la inhalación de **ozono** en alguna concentración y tiempo de exposición suficientes, una reacción celular mediada inmunológica y específicamente a través de linfocitos T predomina en la enfermedad crónica por **berilio**, que tiene como consecuencia una forma granulomatosa de la enfermedad pulmonar. El berilio solo no parece ser antigénico, pero necesita unirse químicamente a alguna molécula grande para funcionar como hapteno (Huang *et al*, 1992).

Los pulmones, efectivamente, son un órgano blanco de los estresantes ambientales en forma de contaminantes del aire. La población celular local inmunológica del pulmón puede estar directamente expuesta a varios tóxicos que se encuentran en el aire, ya que estas células, tales como los macrófagos pulmonares (MAP), juegan una función primordial en la inmunocompetencia del huésped, su función puede estar comprometida por la exposición a los contaminantes y esto puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad pulmonar inducida ambientalmente. Algunos estudios han determinado los

efectos del ozono en aspectos críticos de la actividad de los macrófagos pulmonares involucrados en la inducción de la respuesta inmune mediada por células. Esto concierne a la interacción de los PAM con **citocinas**, principalmente con los **interferones** (IFNalfa e IFNgama). El ozono induce alteraciones en la capacidad de los MAP para participar en la respuesta inmune celular, produciendo en ellos, cambios mecánicos que les impiden interactuar con la citocinas inmunoregulatorias, principalmente los interferones (Schlesinger, 1998).

Las elevadas concentraciones de partículas contaminantes ambientales pueden incrementar la mortalidad y morbilidad en personas con enfermedad pulmonar preexistente, debido a que los macrófagos alveolares del medio ambiente del pulmón enfermo, pueden aumentar la respuesta inflamatoria como resultado de la inhalación de partículas del aire. Cuando se cultivaron macrófagos alveolares sanos tanto de ratones como de humanos estimulados con lipopolisacáridos e incubados posteriormente con distintas partículas del aire, tales como partículas del aire urbano, partículas volátiles de combustibles residuales, partículas sólidas respirables de tamaño de 2.5 micras y partículas inertes de dióxido de titanio (TiO₂), se midió la producción del mediador inflamatorio **Factor de Necrosis Tumoral** (TNF) que se vio aumentada para todas las partículas del aire menos para las inertes de TiO₂. Los resultados de este estudio sugieren que los macrófagos alveolares activados por una inflamación preexistente pueden promover una posterior inflamación debido a una respuesta de citocinas aumentada por la activación de la inhalación de las partículas contaminantes del aire (Imrich *et al*, 1999).

La elevada síntesis y expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-8, la IL-6 y el TNF-alfa asociadas a la exposición e inhalación de materia particulada de menos de 10 micras, parece estar ligada a los metales presentes en el aire contaminado. En un modelo experimental donde se usaron células de epitelio bronquial humano normal y fueron expuestas a una fuente de emisión de contaminantes del aire de partículas de residuos combustibles volátiles conteniendo los metales vanadio, níquel y hierro a diferentes tiempos de exposición y concentración de contaminantes, se midieron las concentraciones de las citocinas inflamatorias IL-6, IL-8 y TNF-alfa así como sus RNAm. Estas concentraciones se encontraron elevadas en cantidades significativas y se disminuyó su

producción cuando se introdujo en el modelo experimental, sustancias quelantes (secuestradoras) de los metales mencionados. Estos resultados demuestran que los metales presentes en los residuos de combustibles volátiles pueden ser responsables de la producción y liberación de los mediadores inflamatorios en el epitelio del tracto respiratorio y sugieren que estos mediadores pueden contribuir a los efectos tóxicos de los contaminantes atmosféricos de la materia particulada reportados en estudios epidemiológicos (Carter *et al*, 1997).

Esto también es corroborado por estudios más recientes en los que efectivamente, se asocia un incremento de mortalidad y morbilidad relacionado a la inhalación de las partículas finas del aire contaminado. Estas partículas son una mezcla compleja de varios componentes, incluyendo los residuos de las cenizas de los combustibles volátiles, un subproducto de las plantas de energía y de la industria de la combustión de combustibles. Esta mezcla puede variar de una región a otra. Las células de epitelio de vías respiratorias altas fueron expuestas a los anteriores contaminantes *in vitro*, encontrando una liberación importante de IL-6, IL-8 y TNF dependiente de la dosis y tiempo de exposición. Para investigar la participación del factor de transcripción NF-kappaB en la producción de IL-6 inducida específicamente, se analizó el incremento del RNAm de la IL-6, el cual fue precedido por la activación de proteínas nucleares unidas a la secuencia motif del factor NF-kappaB en el promotor IL-6. La transfección transitoria de las células epiteliales de vías respiratorias altas con el promotor de la región 5' del gen de IL-6 ligado al gen transportador luciferasa confirmó que la unión del factor NF-kappaB es necesaria para la transcripción del RNAm de IL-6. La respuesta de IL-6 fue inhibida por un compuesto quelante de metales, la deferoxamina, sugiriendo que la activación del NF-kappaB puede estar mediada a través de intermediarios oxígeno reactivos generados por metales de transición encontrados en la materia particulada de los residuos de combustibles volátiles. Esto sugiere que la activación del factor NF-kappaB puede entonces ser un primer paso crítico en la cascada inflamatoria posterior a la exposición de partículas generadas por la combustión de combustibles (Quay *et al*, 1998).

En otro estudio, se analizaron las diferencias entre las partículas sólidas respirables de tamaño de 10 micras (PM₁₀) contra las de tamaño más pequeño (PM_{2.5}) y se observó que

las de mayor tamaño causaban muerte celular y gran producción de citocinas inflamatorias IL-6 y IL-8 en monocitos humanos. Las PM₁₀ produjeron 20 veces más las cantidades de IL-6 y IL-8 que las PM_{2.5}. La citotoxicidad fue inhibida por la deferoxamina (quelante o secuestrador de metales de transición), pero la producción de citocinas no fue inhibida. Solo el lipopolisacárido unido a proteínas inhibió la producción de citocinas inducidas por PM₁₀, sugiriendo que las bacterias gram-negativas y/o las endotoxinas son componentes de PM₁₀. Los efectos pro-inflamatorios de las endotoxinas sobre los macrófagos pueden perturbar la homeostasis del pulmón, mientras que los metales inductores de citotoxicidad /necrosis pueden regular la inflamación independiente de las citocinas derivadas de macrófagos (Moon *and* Becker, 1999).

También la contaminación del aire por esporas de los microbios presentes en el aire interior contaminado de viejos edificios dañados y húmedos, provocan inflamación y toxicidad en los pulmones de los individuos que los habitan, mediado este fenómeno a través del aumento en la concentración de las citocinas IL-6 y el TNF-alfa. En reciente estudio se observó que el aumento de estas citocinas tanto en el fluido de lavado broncoalveolar como en el suero de ratones es dependiente tanto de la dosis como del tiempo de exposición a las esporas de *Streptomyces californicus* (Jussila *et al*, 2001).

En otras investigaciones se ha podido concluir que es posible considerar como marcadores moleculares de inflamación de vías respiratorias altas a las interleucinas principalmente IL-8; también IL-6, la proteína catiónica eosinofílica y a la mieloperoxidasa como respuesta a la exposición a las cenizas de combustibles en los trabajadores que por su tipo de trabajo, están en contacto con ellas. Relacionándose las cenizas de residuos de combustible con altos niveles de materia particulada (PM₁₀) y del metal vanadio (Woodin *et al*, 1998).

La inducción de autoinmunidad por el mercurio afecta a los riñones y a los pulmones y ha sido demostrada con modelos animales (cambios similares a estos se han visto en personas con el síndrome de Goodpasture).

Una **inmunosupresión** ha podido ser demostrada después de la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina).

La **hipersensibilidad o reacciones alérgicas** pueden ocurrir después de la exposición a agentes químicos como el tolueno diisocianato, en el caso del asma ocupacional (Sunyer *et al*, 1991).

Severos daños en el tracto respiratorio y un aumento en la morbilidad de enfermedades cardiovasculares y respiratorias debido a la exposición crónica y frecuente a los contaminantes atmosféricos, puede provocar daños irreversibles en los pulmones, por ejemplo en la fibrosis pulmonar, en el cáncer de pulmón y envejecimiento pulmonar. En situaciones extremas puede observarse además de un aumento en la morbilidad, un aumento en la mortalidad (OMS, 1987). Algunas de las enfermedades categorizadas como enfermedades obstructivas del pulmón debidas a la exposición de contaminantes ambientales son: bronquitis crónica, enfisema y asma (Sunyer *et al*, 1991).

Alteraciones producidas por metales.

Dosis tóxicas de ciertos metales pesados son capaces de alterar el balance natural de oxidación y reducción en algunas células a través de varios mecanismos. El estrés oxidativo puede dañar moléculas de señalización sensibles a las reacciones de óxido-reducción, tales como el NO, AP-1, NF-kappaB, IkappaB, p53, p21ras y otras, y de este modo alterar la señalización celular y los sistemas de expresión de genes. De esta forma pueden producir una gran variedad de efectos tóxicos, incluyendo carcinogénesis. Los metales implicados hierro y cobre, aunque esenciales, cuando están en sobredosis son tóxicos. Otros metales que están bien establecidos como carcinógenos humanos son el níquel, el cromo y el cadmio (Buzard *and* Kasprzak, 2000).

La toxicidad del aluminio (Al) ha sido sujeto de muchas controversias en las décadas pasadas; se ha considerado un metal inocuo para la salud humana, sin embargo, se ha establecido una función causal para el Al en cierto tipo de demencia, en la osteomalacia y en la anemia microcítica sin deficiencia de hierro. En recientes investigaciones, se han presentado evidencias de las reacciones oxidativas del Al y su relación con la enfermedad

de Alzheimer. Aunque el mecanismo de la toxicidad del aluminio aún es desconocido, evidencias clínicas y epidemiológicas sugieren una liga importante entre las especies oxígeno reactivas como el Al y el inicio de un proceso inflamatorio en cascada, involucrado en la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa (Campbell, 2000). De las citocinas inflamatorias encontradas en altos niveles en la enfermedad de Alzheimer, una es la IL-6 (Terreni, 1998) así como el TNF-alfa, considerándose que esta citocina debido a que sus receptores TNF-alfa comparten un alto grado de homología con los receptores neurotróficos, activa vías de señalización inadecuadas y puede de este modo, alterar las funciones neurotróficas del sistema nervioso central (Macdonald *et al*, 2000).

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad, a nivel mundial, se tiene conocimiento de un alto incremento en los niveles de contaminación atmosférica así como del impacto que ésta tiene en la salud, especialmente en enfermedades de vías respiratorias y en general del sistema inmune.

En distintos países se han hecho investigaciones acerca de los parámetros inmunológicos que pudieran verse afectados por la constante presencia de contaminantes ambientales presentes en el aire contaminado. Así, se ha tratado de encontrar biomarcadores sensibles que indiquen hasta qué grado está afectando la contaminación atmosférica a los individuos expuestos a ella. La mayoría de estos estudios ha realizado los análisis de parámetros inmunológicos en modelos *in vitro* o en lavado nasal y lavado bronquioalveolar, por representar éstas las áreas fisiológicas más directamente afectadas, encontrando en un amplio número de casos, elevada la concentración de algunas citocinas pro-inflamatorias, pero sin reportes científicos a nivel sistémico.

Nuestro país y en especial la ciudad de Guadalajara con su acelerado desarrollo y crecimiento, no es la excepción al problema de salud que ocasionan los actuales niveles de contaminación ambiental, pero no existe ningún estudio al respecto.

Por lo que fue necesario buscar marcadores sensibles a los cambios inmunológicos a nivel sistémico, a través del análisis de parámetros inmunológicos de alta sensibilidad, económicos y lo menos invasivos posibles. Nosotros propusimos medir los niveles de interleucinas proinflamatorias como la **IL-1alfa**, **IL-1beta**, **IL-6**, y el **TNF-alfa** en suero sanguíneo y no en lavado nasal ni bronquioalveolar o en modelos *in vitro*; Con lo anterior se podrían tener criterios para revisar la forma en que se encuentra afectado el sistema inmune de individuos expuestos a contaminantes del aire de la ciudad de Guadalajara.

IV.- OBJETIVOS.

Objetivo General:

Evaluar los niveles de Interleucinas pro-inflamatorias en el suero y sobrenadante de cultivo linfocitario de individuos jóvenes sanos expuestos a diferentes niveles de contaminación atmosférica en la zona centro de Guadalajara y en Tlajomulco de Zúñiga.

Objetivos Particulares:

1. Realizar ensayos de linfoproliferación bajo el estímulo de fitohemaglutinina, en las muestras de sangre periférica de ambos grupos de estudio.
2. Determinar los niveles de citocinas pro-inflamatorias Interleucina-6 (IL-6), de Interleucina-1alfa (IL-1 α), de Interleucina-1beta (IL-1 β) y del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en el suero y en el sobrenadante de los cultivos linfocitarios de ambos grupos de muestras, mediante la prueba de ELISA.
3. Determinar y analizar los niveles de concentración de contaminantes atmosféricos como el NO₂ (dióxido de nitrógeno), el SO₂ (dióxido de azufre), CO (monóxido de carbono), CO₂ (bióxido de carbono) y el O₃ (ozono), tanto en la zona centro de Guadalajara como en Tlajomulco de Zúñiga durante los días de la obtención de las muestras sanguíneas.
4. Realizar el análisis estadístico descriptivo e inferencial sobre las medias y varianzas de las determinaciones inmunológicas entre ambos grupos de estudio.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS.

SELECCIÓN DE LA ZONA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO.

Para la realización de este trabajo, se consideraron las poblaciones de dos zonas geográficas distintas; **la zona centro de la ciudad de Guadalajara** y **el pueblo de Tlajomulco de Zúñiga.**

Se necesitaba contrastar entre una población de control con una calidad de aire muy buena, es decir, con los índices de contaminación más bajos, por lo que se seleccionó a Tlajomulco de Zúñiga, de acuerdo a la recomendación del Instituto de Astronomía de la Universidad de Guadalajara. Tlajomulco debido a su situación geográfica, presenta similitud de las condiciones meteorológicas con Guadalajara y por la dirección de sus vientos en sentido contrario, no recibe corrientes de aire de Guadalajara que pudieran contaminar su propio ambiente.

La otra población de contraste, la de la zona centro de Guadalajara, se seleccionó por conocerse los datos sobre su contaminación atmosférica que la ubican como una de las zonas de Guadalajara con los índices más altos de contaminación del aire debido a que es una zona con gran tránsito vehicular; de acuerdo con los datos reportados por la RAMA de la COESE, durante 1996 y 1997.

FORMA DE OBTENCIÓN DE LOS DATOS SOBRE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.

Los datos de los contaminantes atmosféricos en el pueblo de Tlajomulco de Zúñiga fueron obtenidos mediante su determinación experimental realizada con una estación móvil de monitoreo ambiental de la Comisión Estatal de Ecología del Instituto de Astronomía y Meteorología de la U. de G.; y fueron efectuados de manera sincrónica con el tiempo de la toma de muestras sanguíneas. Este monitoreo ambiental fue llevado a cabo por el Ing. Químico Mario Enrique García Guadalupe del mismo Instituto.

Los datos sobre los contaminantes atmosféricos en la zona centro de Guadalajara fueron obtenidos en la estación automática de monitoreo ambiental de la COESE y fueron

solicitados a dicha institución a través del Instituto de Meteorología de la U. de G. Las técnicas de medición corresponden a los estándares establecidos por la Organización Mundial de la Salud y las Normas Oficiales Mexicanas aplicables.

PERÍODO DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la selección de las fechas del muestreo se consideraron los diferentes períodos estacionales que conllevan diferentes niveles de contaminación atmosférica, así como la disponibilidad tanto de recursos materiales como humanos. De esta forma, de acuerdo a los resultados obtenidos por el Instituto de Astronomía y Meteorología de la U de G de la distribución anual de los principales contaminantes en la ZMG, se estima que:

1. El principal máximo en el comportamiento anual de los promedios mensuales de PM_{10} y de CO se observó en **enero y el segundo en mayo**, en donde el máximo principal pudo ser explicado por el efecto de acumulación de los contaminantes en el transcurso de los meses de invierno en presencia de la circulación anticiclónica dominante.
2. En el caso del ozono se registró el **único máximo en el mes de mayo**, cuando se observaron el flujo máximo de radiación global y las temperaturas más altas en la región.
3. El bióxido de nitrógeno tuvo el máximo principal en el mes de mayo igual que el ozono, pero además hubo un máximo secundario, registrado en el mes de enero.

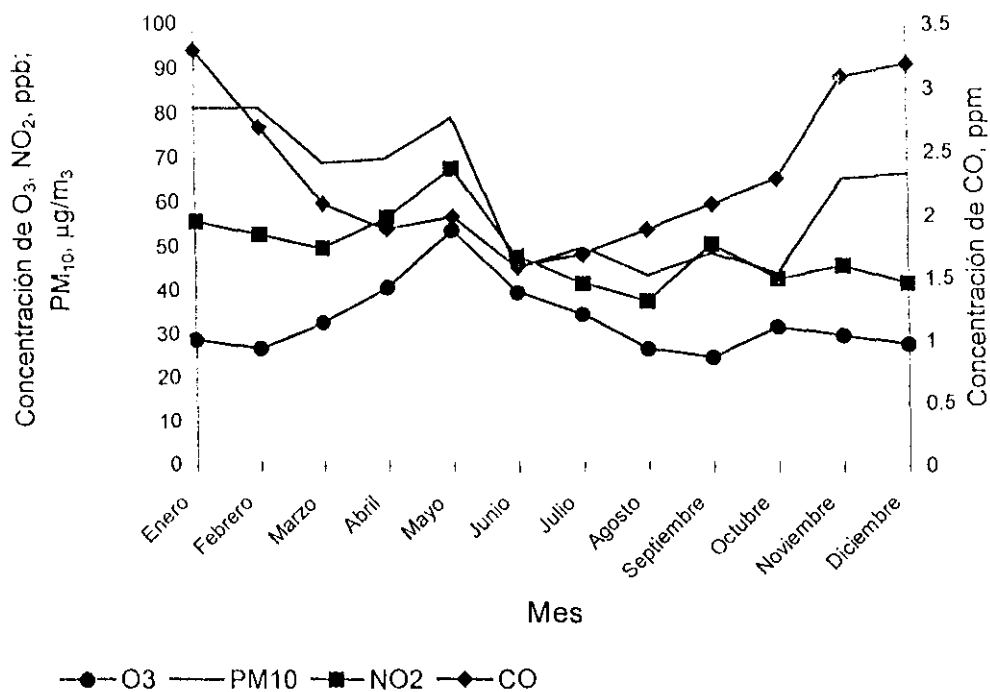


Figura 2. Distribución anual de contaminantes en la ZMG.

Se consideró entonces el mes de mayo por ser el mes donde se encontraron los máximos promedios de contaminación y por ser un período previo a la llegada de las lluvias, lo que trae consigo una disminución de los contaminantes atmosféricos; esto con la finalidad de revisar los parámetros inmunológicos en un momento de alta concentración de contaminantes atmosféricos

Los días del muestreo fueron el 29, 30 y 31 de mayo del 2000, además del 15 de junio del 2000. Estos días se muestreó tanto en Guadalajara como en Tlajomulco. El horario de obtención de las muestras también fue seleccionado de acuerdo a las horas en que se han detectado los picos máximos de contaminación para la mayoría de los parámetros, de acuerdo a datos obtenidos por la COESI. En la siguiente figura se observa que los contaminantes CO, SO₂, y PM₁₀ tienen dos picos máximos, uno entre 9 y 10 horas y el otro a las 21 horas. Estos picos coinciden con las horas de mayor movimiento vehicular en la ZMG.

En general, la mayoría de los contaminantes tiene su concentración más alta a las mismas horas, excepto el ozono que presenta su máximo entre las 14 y 15 horas. Debido a lo anterior se decidió hacer las tomas de muestras por la mañana, entre las 9 y las 11 horas.

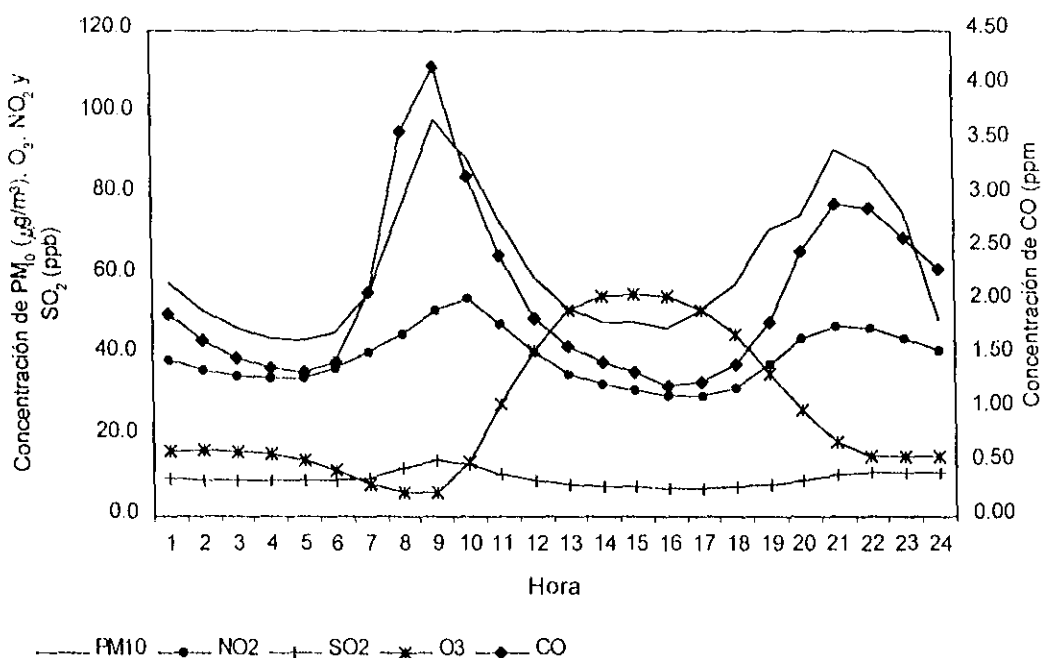


Figura 3. Distribución horaria de los contaminantes O_3 , CO , NO_2 , PM_{10} y SO_2 , en la ZMG.

GRUPO DE MUESTRAS SELECCIONADAS.

Universo de Trabajo:

Los sujetos del estudio en ambas zonas, tanto de Guadalajara como de Tlajomulco, fueron estudiantes de nivel bachillerato de la preparatoria de Tlajomulco de Zúñiga y de la escuela preparatoria de Jalisco, que se encuentra en la zona centro de Guadalajara. En ambos casos, bajo consentimiento de ellos.

Universo de inclusión:

Se consideró seleccionar solamente estudiantes del sexo masculino para evitar variaciones que las mujeres pueden presentar en su sistema inmunológico debidas a su sistema hormonal distinto al de los hombres. Sin embargo, debido a la falta de suficientes muestras, finalmente se consideraron a algunas mujeres, cuyo criterio de inclusión fue el momento del período menstrual en el que se encontraban. Después de responder a un interrogatorio clínico se consideraron aquellas mujeres que se encontraban en un momento donde la concentración hormonal es baja.

La edad de los individuos osciló entre 16 y 21 años, por considerar que este grupo de edad tienen, por lo general, un estilo de vida homogéneo. No han sido expuestos a

cantidades considerables de medicamentos y son una población donde interesa identificar de manera oportuna y preventiva posibles daños en su salud.

Otro criterio de inclusión fue seleccionar solamente individuos sanos. **Para evaluar el estado general de salud** de los sujetos de estudio, se aplicó un cuestionario (ver en el anexo # 7) para identificar el nivel socioeconómico, las exposiciones a diferentes agentes biológicos y químicos que pudieran afectar su estado inmune o su genoma, se les realizó un examen físico exploratorio para excluir a aquellos que al momento de la toma de muestra presentaran algún signo o síntoma patológico y además se obtuvieron exámenes de Biometrías Hemáticas y Bioquímicas sanguíneas (apoyo prestado por el IMSS) para incluir solo a los que resultaran dentro de los rangos de referencia normales.

Universo de exclusión:

Se excluyeron todos aquellos que no cumplieron con las especificaciones anteriores.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Debido a las dificultades para obtener suficientes individuos para el estudio, el número de muestras fue de un total de 42. Donde 20 fueron de Tlajomulco y 22 de Guadalajara; de Tlajomulco todas las muestras fueron de hombres y de las 22 muestras de Guadalajara, 11 fueron de mujeres.

MUESTREO.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica venosa tomadas con el sistema vacutainer, con tubos al vacío.

Para la realización de los ensayos linfoproliferativos se tomaron muestras de 5-7 ml de sangre con anticoagulante EDTA y para el análisis de interleucinas se tomaron muestras de 5-7 ml de sangre sin anticoagulante.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACION O RESPUESTA PROLIFERATIVA. (CULTIVO CELULAR).

- 5 **Metodología usada para el ensayo de Linfoproliferación en sangre periférica humana.**

Medio de Cultivo:

Para lograr la proliferación de los linfocitos humanos en este cultivo celular se utilizó el medio de cultivo RPMI-1640 (medio 1640 del Roswell PARK Institute, Sigma Chem. Co. R-6504). Este medio fue debidamente suplementado con la adición de un 10 % de suero fetal bovino (SFB.)

Mitógeno:

Como mitógeno para lograr la estimulación necesaria para la activación linfocitaria, se usó 0.1 ml de fitohemaglutinina (PIIA) a una concentración de 10 µg/ml. (Sigma Chem. Co. L9132)

Separación de los Linfocitos en sangre periférica:

El volumen de muestra de sangre total (con anticoagulante heparina) utilizada fue de 5 ml. Se diluyó volumen a volumen con medio RPMI-1640 sin suplementar y posteriormente, colocada la muestra diluida en un tubo cónico, se le adicionó lymphoprep de marca Nycomed (que tiene la capacidad de separar las células por gradiente de densidad), también volumen a volumen, suavemente, escurriendo por la pared del tubo para evitar que se mezclaran. Se centrifugó la anterior mezcla a 1200 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 20 minutos para asegurar la adecuada separación del paquete celular y así poder obtener a los linfocitos. Se separó el anillo de linfocitos con una pipeta pasteur y se colocaron en un tubo nuevo, donde se les adicionó aprox. 7 ml. de medio RPMI-1640 para lavarlos, centrifugándolos posteriormente a 1200 r.p.m. durante 5 min. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones. Esto garantiza una mayor obtención de linfocitos que además no tengan residuos de impurezas celulares u otras. En la segunda centrifugación se desechó el sobrenadante y se obtuvo el botón celular, mismo que se resuspendió en un ml de medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal.

Para evaluar la viabilidad de los linfocitos obtenidos, se tomaron 15 μ l de células que se diluyeron volumen a volumen con el colorante azul de tripano al 0.4 % (Sigma Chem. Co. T8154). Considerando que las células muertas incorporan el azul de tripano, se hizo un conteo de células en la cámara de Neubauer para determinar por exclusión del colorante (células no teñidas), la cantidad de células viables para su posterior cultivo.

Siembra de los Cultivos:

Para realizar la siembra de los linfocitos viables se ajustaron las células a un volumen adecuado con RPMI, para tener una cantidad de 200 000 (2×10^5) células en 0.1 ml. de suspensión celular por cada pozo que se necesitó sembrar.

Se sembraron los pozos necesarios, haciendo cada prueba por duplicado, en cajas de cultivo de 96 pozos (Corning Glass Works, 25861, New York 14831).

A cada pozo se le agregaron 200 000 células ajustadas a un volumen de 0.1 ml con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado. También se agregaron 0.1 ml del mitógeno PHA (10 μ g/ml) para activar la proliferación de los linfocitos en estudio. Se incubaron las células sembradas durante 48 horas en estufa de 37°C, 1 atm. de presión, 5 % de CO₂ y 95 % de aire (Estufa CO₂ Model 302, NAPCO E series). Al término de este tiempo, se adicionó a cada pozo de los cultivos un pulso de 10 μ l de timidina tritiada (0.5 Ci de methyl-³H Thymidine marca Amher shame), incubándolos nuevamente en las mismas condiciones anteriores por 24 horas más. Al cabo de este tiempo, se cosecharon las células proliferadas.

Cosecha de los cultivos:

La intención de esta cosecha es medir la incorporación de timidina tritiada por las células que se dividieron. Para lograrlo, se utilizó un cosechador semi-automático que permite que las células queden adheridas a un papel filtro, mismo que se deja secar, se coloca en viales de vidrio especiales para lectura del contador de centelleo, se les coloca 3 ml de líquido de centelleo [PPO: 2-5 difenil oxazol (Sigma Chem. Co. D-4630), Popop [1,4-bis (5-phenyl-2-oxazolyl) benceno, 2,2-p-phenylene-bis (5-phenyloxazole)] y tolueno], a cada vial, que contiene el papel filtro con las células de un solo pocillo de la caja de cultivo. Luego se colocaron los viales en el contador de centelleo de radiaciones β (Beckman, USA LS6000SF), para la medición de la síntesis de ADN lograda, a través de la

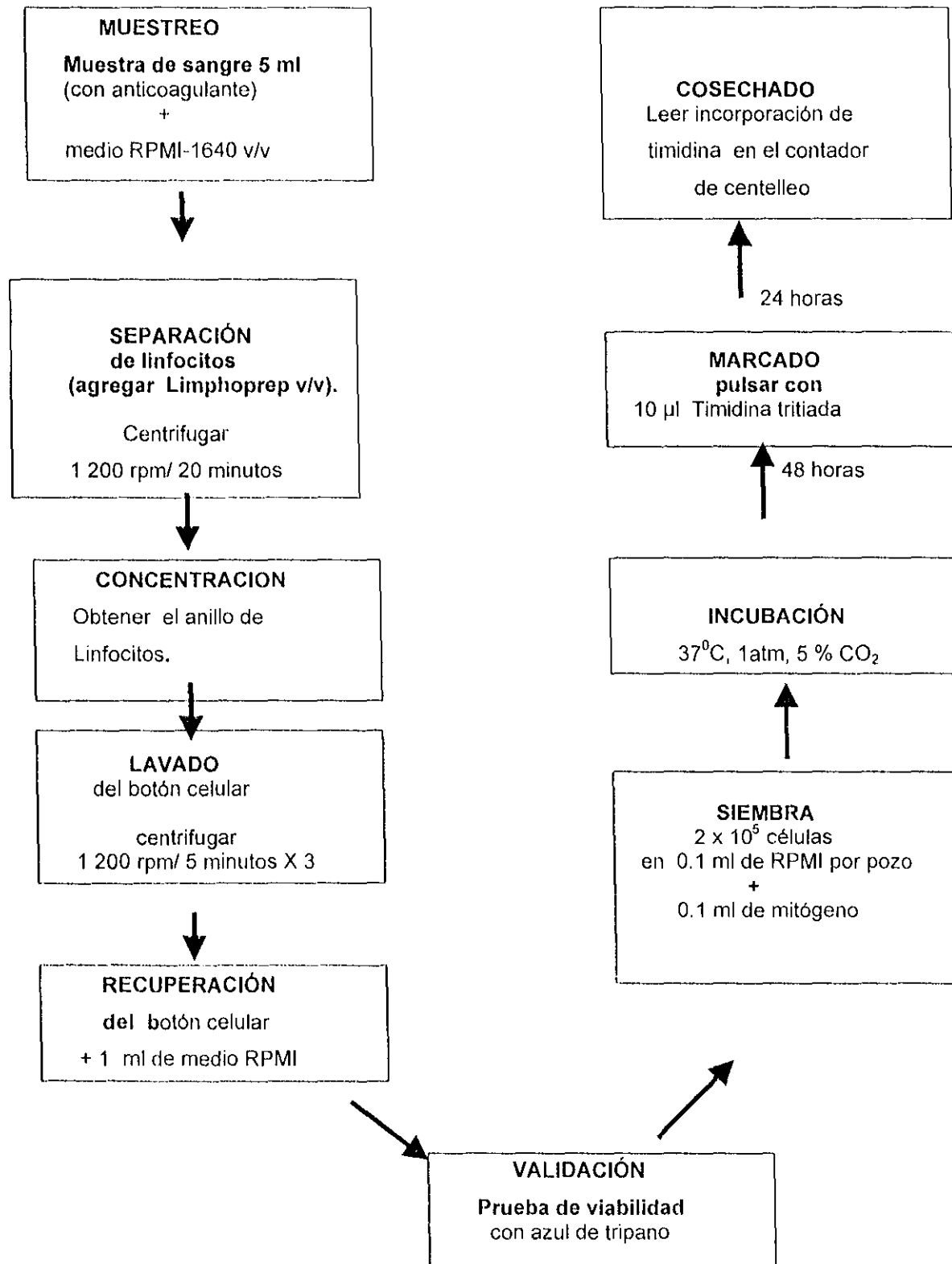
incorporación del nucleótido timidina con la marca radiactiva del ^3H (tritio). Los resultados, sobre linfoproliferación de la timidina incorporada se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

La transformación blastoide es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria, se expresa sobre la base de las cpm no estimuladas (en los cultivos de control, sin PHA) dividida entre las cpm estimuladas (con PHA), lo cual proporciona un cociente referido como el Índice de Estimulación **IE**. (Jacoby *and* Pastan, 1979).

Análisis Estadístico de los resultados:

Para hacer el análisis comparativo de la linfoproliferación en ambos grupos de estudio, se usó el modelo estadístico de análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % del programa SPSS 9.0 (Statistic Program Science Social). Las gráficas de los resultados se hicieron con el programa de computación Estadística W.

**Diagrama de flujo (procedimiento sintético)
del ensayo de Linfoproliferación.**



OBTENCIÓN DE LÍQUIDO SOBRENADANTE DE LOS CULTIVOS LINFOCITARIOS.

Para obtener sobrenadantes de los cultivos celulares, se hicieron cultivos dobles de cada muestra seleccionada, de tal forma que el segundo cultivo para la obtención de sobrenadantes se hizo con la misma metodología anterior, sólo aumentando el número de pozos por muestra para obtener suficiente líquido sobrenadante y sin marcar con la timidina tritiada [$^3\text{H-Tdr}$], ya que no se les iba a medir la incorporación de ésta. Así que solo fueron conservados 48 horas en cultivo, al cabo de las cuales se recogieron los sobrenadantes por aspirado con micropipetas automatizadas y se almacenaron en tubos eppendorf para su congelamiento a -20°C y posterior evaluación de la concentración de Interleucinas.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-6 EN SUERO SANGUÍNEO Y SOBRENADANTES DE CULTIVO LINFOCITARIO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo se efectuó con un kit comercial de ELISA (BIOTRAK High sensitivity interleukin-6 [(h)IL-6]human, ELISA system code RPN 2784) de Amersham Pharmacia Biotech.

Este procedimiento inmunoenzimático, es una técnica cuantitativa tipo "sándwich". Dicho sistema está basado en una fase sólida ELISA, la cual utiliza un anticuerpo para IL-6 humana unido a los pozos de una microplaca, el cual se une específicamente a la IL-6 que se encuentre presente en las muestras de suero. Para hacer evidente esta reacción antígeno-anticuerpo, el sistema utiliza otro anticuerpo anti IL-6 humana marcado con la enzima biotina [biotinylated antibody to (h)IL-6], que se une a la IL-6 que se inmoviliza por estar unida al primer anticuerpo anti IL-6 fijado a la placa. También utiliza un reactivo amplificador de la reacción (Amdex amplification reagent*) que se une al anticuerpo inmovilizado y al anticuerpo biotinilado para aumentar la sensibilidad de la prueba. Posteriormente se adiciona a los pozos un sustrato sobre el cual actúa la enzima biotina desarrollando un color proporcional a la cantidad de IL-6 existente en las muestras de suero.

*Amdex amplification reagent:

Éste es un conjugado multifuncional con una significativa actividad potenciadora no específica pero controlada, que consiste en un conjugado que utiliza una cadena sencilla hidrofílica de respaldo, a la cual se unen cientos de moléculas de peroxidasa de rábano que son covalentemente acopladas, junto con un promedio de 10 moléculas de estreptavidina.

Metodología de la técnica para IL-6:

NOTA: Se utilizó el suero obtenido por separación de las muestras sanguíneas sin anticoagulante, así como los sobrenadantes recogidos de los cultivos celulares.

- 1.- Los reactivos y estándares de trabajo para montar la curva de calibración se prepararon siguiendo las indicaciones del kit comercial. (Ver detalles en anexo # 1)
- 2.- Se prepararon todas las tiras suficientes de la microplaca para correr tanto los estándares de trabajo como las muestras problemas.
- 3.- Se corrieron las pruebas **por duplicado**, colocando blancos de reactivo y una curva de calibración con estándares de concentración conocida proporcionados por el kit al mismo tiempo que se corrieron las muestras a analizar.
- 4.- Se pipeteó 100 µl de diluyente estándar en los pocillos del blanco.
- 5.- Se pipeteó 100 µl de cada concentración del estándar para hacer la curva de calibración en los pocillos de la curva estándar.
- 6.- Se pipeteó 100 µl de cada muestra problema (sueros y sobrenadantes) en los pocillos restantes de la microplaca.
- 7.- Se cubrió la microplaca con un plástico adhesivo proporcionado por el kit y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente (20-25 °C) en una placa con movimientos rotatorios.
- 8.- Se lavaron los pozos por llenado y decantación de los pocillos con una pizeta usando el buffer de lavado proporcionado por el kit. Se repitieron 3 veces los lavados y al final se aspiró el exceso de buffer por inversión de la placa sobre toallas de papel secante.
- 9.- Se pipetearon 100 µl del anticuerpo biotinilado en todos los pozos. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con continuos movimientos.

- 10.- Se repitió el lavado de los pozos como se indica en el paso 8.
- 11.-Se pipetearon 100 μ l de reactivo amplificador en todos los pozos, se cubrió la placa incubándola por 30 minutos a temperatura ambiente y con movimiento continuo.
- 12.- Se repitió el lavado de los pozos como se indica en el paso 8.
- 13.- Se pipetearon 100 μ l del sustrato TMB dentro de todos los pozos, sin cubrir esta vez la placa incubándola por 30 minutos a temperatura ambiente y con movimiento continuo.
- 14.- Se pipetearon 100 μ l de la solución de parada de la reacción enzimática (ácido sulfúrico al 0.18 M) dentro de todos los pozos.
- 15.- Se determinó la densidad óptica de cada pozo a 450 nanómetros de longitud de onda, durante los 30 minutos siguientes de la prueba, usando un lector para ELISAs “Microwell Strip Reader Model EL301” de BIOTEK^R INSTRUMENTS. INC

Diagrama de flujo de la Técnica de ELISA para IL-6

	(blanco) Cero	estándares	muestras
Estándar IL-6	----	100 μ l	----
Diluyente estándar	100 μ l	-----	-----
Muestra	-----	-----	100 μ l

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /2 horas
Con movimiento constante

LAVADO
Aspirar/decantar con Buffer
4 veces

Reactivo Anticuerpo Biotinilado	100 μ l	100 μ l	100 μ l
------------------------------------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

LAVADO con buffer /4 veces

Reactivo amplificador Amdex	100 μ l	100 μ l	100 μ l
--------------------------------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

LAVADO con buffer /4 veces

SUBSTRATO	100 μ l	100 μ l	100 μ l
-----------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

Solución de Detención de la reacción	100 μ l	100 μ l	100 μ l
---	-------------	-------------	-------------

Leer la densidad óptica a 450 nm/30
min siguientes.

INFORMACIÓN ADICIONAL DE LA TÉCNICA:**Especificidad:**

Este ensayo reconoce tanto a la IL-6 natural como a la recombinante. No tiene reacción cruzada con IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7 IL-8, TNFalfa, IFNgamma , GM-CSF o IL-6 de ratón ni de rata.

Calibración:

Los estándares en este ensayo son calibrados en referencia a el NIBSC lote 89/548.

Un (1) pg de estándar Biotrak = 3pg de estándar NIBSC= 0.3 unidades NIBSC.

Reproducibilidad:**Precisión interna del ensayo:**

El coeficiente de variación interno de este ensayo de ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Precisión entre ensayos:

El coeficiente de variación entre ensayos de este ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Sensibilidad:

La dosis mínima detectable de (h)IL-6 fue determinada por ser de 0.1 pg/ml (0.01 pg/pozo), por adición de 2 desviaciones estándar a la Densidad Óptica del valor del cero y por el cálculo correspondiente de la concentración en la curva estándar.

Paralelismo:

La linealidad de dilución fue determinada por diluciones seriadas de 6 diferentes muestras positivas. Las diluciones fueron ensayadas por ELISA y las dosis “encontradas” fueron graficadas contra las dosis esperadas.

Valores esperados de la prueba:

Los niveles normales de (h)IL-6 en muestras de suero están en el rango de 0-14.9 pg/ml.

Los niveles normales de (h)IL-6 en muestras de plasma están en el rango de 0-1.6 pg/ml.

Los niveles normales de (h)IL-6 en muestras de orina están en el rango de 0-0.6 pg/ml.

(Tomado del inserto del kit comercial del proveedor).

➤ MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1beta EN SUERO SANGUÍNEO Y SOBRENADANTES DE CULTIVO LINFOCITARIO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo se efectuó con un kit comercial de ELISA (BIOTRAK Interleukin-1 beta [(h)IL-1_B]human, ELISA system code RPN 2751) de Amersham Pharmacia Biotech.

Este inmunoensayo enzimático emplea una técnica cuantitativa tipo sándwich. Donde un anticuerpo específico para Interleucina 1 tipo beta humana [(h)IL-1_B] ha sido fijado a los pozos de la microplaca que provee el kit. Las muestras a las que se les va a determinar la IL-1_B son pipeteadas dentro de los pozillos, seguidas del anticuerpo biotinilado (marcado con la enzima biotina). Si la IL-1beta se encuentra presente en las muestras problema, se unirá específicamente a el anticuerpo anti IL-1beta inmovilizado en la placa y al anticuerpo biotinilado. Después de la incubación y el posterior lavado, se eliminaron todas las proteínas de la muestra que no se unieron específicamente, así como el Ac biotinilado que no reaccionó. Se le adiciona un conjugado de streptavidin-HRP en los pozos; cualquier proteína de IL-1beta que se haya unido tanto al Ac anti IL-1beta como al Ac biotinilado durante la primera incubación se une al conjugado de streptavidin. Después de la incubación y el posterior lavado para eliminar todas las proteínas que no se hayan unido, se le adiciona un substrato que actúa sobre la enzima para que se desarrolle el color en proporción a la cantidad de IL-1beta unida en el paso inicial.

Además de las muestras, se corrieron al mismo tiempo y por duplicado, una serie de pocillos usando concentraciones conocidas de estándares de (h)IL-1beta suministradas por el kit comercial para realizar una curva de calibración, en la cual se graficaba la densidad óptica contra la concentración de los estándares conocidos. Se determinó entonces por traspolación en la curva la concentración de las muestras problemas, tanto de los sueros como de los sobrenadantes. (Tomado del inserto del kit comercial del proveedor).

Metodología de la técnica para H.-1beta:

- 1.- Se prepararon los reactivos y los estándares de trabajo como se describía en el kit comercial. (Curva de calibración en el anexo # 2).
- 2.- Se programó la microplaca para utilizar los pocillos tanto para los blancos, los estándares de concentraciones conocidas para la curva de calibración, como las muestras de suero y los sobrenadantes para determinarles la concentración de H.-1beta.
- 3.- Se adicionaron 50µl tanto del blanco, estándares y muestras en los pocillos programados. Todos se corrieron por duplicado.
- 4.- Se adicionaron 50µl de anticuerpo biotilado en todos los pozos y se cubrió la placa con una tira adhesiva especial del kit incubándola por 3 horas a temperatura ambiente (20- 25 °C).
- 5.- Se lavaron los pocillos de la placa por llenado y decantación con el buffer de lavado suministrado por el kit, usando una pizeta, se repitió el lavado por tres ocasiones y al final se aspiró el exceso de buffer de los pocillos con una toalla de papel secante.
- 6.- Se adicionaron 100µl del conjugado de estreptavidin-HRP en cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20- 25 °C).
- 7.- Se lavaron nuevamente los pozos como se describe en el paso # 5.
- 8.- Se adicionaron 100µl de la solución del sustrato TMB para la enzima en cada pocillo. Se incubó la placa, sin cubrir con la tira adhesiva, por 30 minutos a temperatura ambiente (20- 25 °C) pero manteniendo la placa en la oscuridad para el adecuado desarrollo del color.
- 9.- Se adicionaron a todos los pozos, 100µl de solución de ácido sulfúrico al 0.18 M, suministrado por el kit, para parar la reacción de desarrollo del color.
- 10.- Se determinó la Densidad Óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos siguientes usando una longitud de onda de 450 nm. El aparato utilizado para este efecto fue el "Microwell Strip Reader Model EL301" de BIOTEK^R INSTRUMENTS. INC

Diagrama de flujo de la Técnica de ELISA para IL-1beta

	(blanco) Cero	estándares	muestras
Estándar IL-1beta	----	50 μ l	-----
Diluyente estándar	50 μ l	-----	-----
Muestra	-----	-----	50 μ l
Anticuerpo Biotinilado	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Incubación a $^{\circ}$ T amb./3horas

LAVADO
Aspirar/decantar con buffer /3 veces

Conjugado Streptavidin-HRP	100 μ l	100 μ l	100 μ l
-------------------------------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

LAVADO con buffer /3 veces

SUBSTRATO	100 μ l	100 μ l	100 μ l
-----------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min. /oscuridad

Solución de Parado de la reacción	100 μ l	100 μ l	100 μ l
--------------------------------------	-------------	-------------	-------------

Determinar la densidad óptica de cada pocillo a una λ de 450 nm dentro de los siguientes 30 min.

INFORMACIÓN ADICIONAL DE LA TÉCNICA:**Especificidad:**

Este ensayo reconoce tanto a la IL-1 beta natural como a la recombinante. No tiene reacción cruzada con IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 IL-8, TNFalfa, IFNalfa, IFNgamma o IL-1beta de ratón.

Calibración:

Los estándares en este ensayo son calibrados en referencia a el NIBSC lote 86/680.

Un (1) pg de estándar Biotrak = 2.0 NIBSC pg.

Reproducibilidad:**Precisión interna del ensayo:**

El coeficiente de variación interno de este ensayo de ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Precisión entre ensayos:

El coeficiente de variación entre ensayos de este ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Sensibilidad:

La dosis mínima detectable de (h)IL-1beta fue determinada por ser de <1pg/ml (0.05 pg/pozo), por adición de 2 desviaciones estándar a la Densidad Óptica del valor del cero y por el cálculo correspondiente de la concentración en la curva estándar.

Paralelismo:

La linealidad de dilución fue determinada por diluciones seriadas de 6 diferentes muestras positivas. Las diluciones fueron ensayadas por ELISA y las dosis "encontradas" fueron graficadas contra las dosis esperadas.

(Tomado del inserto del kit comercial del proveedor).

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1alfa EN SUERO SANGUÍNEO Y SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR LINFOCITARIO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

También aquí se utilizó un kit comercial de ELISA (BIOTRAK Interleukin-1 alpha [(h)IL-1_{alfa}]human, ELISA system code RPN 2750) de Amersham Pharmacia Biotech.

También esta es una prueba cuantitativa tipo sándwich. Donde un anticuerpo específico para Interleucina 1 tipo alfa humana [(h)IL-1_{alfa}] ha sido fijado a los pozos de la microplaca que provee el kit. Las muestras a las que se les va a determinar la IL-1 alfa son pipeteadas dentro de los pozillos, seguidas del anticuerpo biotinilado (marcado con la enzima biotina). Si la IL-1_{alfa} se encuentra presente en las muestras problema, se unirá específicamente a el anticuerpo anti IL-1_{alfa} inmovilizado en la placa y al anticuerpo biotinilado. Después de la incubación y por un posterior lavado, se eliminan todas las proteínas de la muestra que no se unieron específicamente, así como el Ac biotinilado que no reaccionó. Se le adiciona un conjugado de streptavidin-HRP en los pozos; cualquier proteína de IL-1_{alfa} que se haya unido tanto al Ac anti IL-1_{alfa} como al Ac biotinilado durante la primera incubación se une al conjugado de streptavidin. Después de la incubación y el posterior lavado para eliminar todas las proteínas que no se hayan unido, se le adiciona un sustrato que actúa sobre la enzima para que se desarrolle el color en proporción a la cantidad de IL-1_{alfa} presente en las muestras a determinar.

Además de las muestras, se corrieron al mismo tiempo y por duplicado, una serie de pocillos usando concentraciones conocidas de estándares de (h)IL-1_{alfa} suministradas por el kit comercial para realizar una curva de calibración, en la cual se graficaba la densidad óptica contra la concentración de los estándares conocidos. Se determinó entonces por traspolación en la curva, la concentración de las muestras problemas, tanto de los sueros como de los sobrenadantes.

Metodología de la técnica para IL-1alfa:

1.- Se prepararon los reactivos y los estándares de trabajo como se describía en el kit comercial. (Para la curva de calibración, ver anexo // 3).

- 2.- Se programó la microplaca para utilizar los pocillos tanto para los blancos, los estándares de concentraciones conocidas para la curva de calibración, como las muestras de suero y los sobrenadantes para determinarles la concentración de H₁-1alfa.
- 3.- Se adicionaron 50µl tanto del blanco, estándares y muestras en los pocillos programados. Todos se corrieron por duplicado. Se cubrió la microplaca con una tira adhesiva suministrada por el kit y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (20- 25 °C).
- 4.- Se adicionaron 50µl de anticuerpo biotilado en todos los pozos y se cubrió la placa con una tira adhesiva especial del kit incubándola por 1 hora a temperatura ambiente (20- 25 °C).
- 5.- Se lavaron los pocillos de la placa por llenado y decantación con el buffer de lavado suministrado por el kit, usando una pizeta, se repitió el lavado por tres ocasiones y al final se aspiró el exceso de buffer de los pocillos con una toalla de papel secante.
- 6.- Se adicionaron 100µl del conjugado de estreptavidin-HRP en cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20- 25 °C).
- 7.- Se lavaron nuevamente los pozos como se describe en el paso # 5.
- 8.- Se adicionaron 100µl de la solución del substrato TMB para la enzima en cada pocillo. Se incubó la placa, sin cubrir con la tira adhesiva, por 30 minutos a temperatura ambiente (20- 25 °C) pero manteniendo la placa en la obscuridad para el adecuado desarrollo del color.
- 9.- Se adicionaron a todos los pozos, 100µl de solución de ácido sulfúrico al 0.18 M, suministrado por el kit, para parar la reacción de desarrollo del color.
- 10.- Se determinó la Densidad Óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos siguientes usando una longitud de onda de 450 nm. El aparato utilizado para este efecto fue el "Microwell Strip Reader Model EL301" de BIOTEK^R INSTRUMENTS. INC

Diagrama de flujo de la Técnica de ELISA para IL-1 α

	(blanco) Cero	estándares	muestras
Estándar IL-1 α	-----	50 μ l	-----
Diluyente estándar	50 μ l	-----	-----
Muestra	-----	-----	50 μ l

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /1 hora

Reactivo Anticuerpo Biotinilado	50 μ l	50 μ l	50 μ l
---------------------------------	------------	------------	------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /1 hora.

LAVADO
Aspirar/decantar con buffer /3 veces

Conjugado Streptavidin-HRP	100 μ l	100 μ l	100 μ l
----------------------------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

LAVADO con buffer /3 veces

SUBSTRATO	100 μ l	100 μ l	100 μ l
-----------	-------------	-------------	-------------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min/oscuridad.

Solución de detención de la reacción	100 μ l	100 μ l	100 μ l
--------------------------------------	-------------	-------------	-------------

Determinar la densidad óptica de cada pocillo a una λ de 450 nm dentro de los siguientes 30 min.

INFORMACIÓN ADICIONAL DE LA TÉCNICA:

Especificidad:

Este ensayo reconoce tanto a la IL-1 alfa natural como a la recombinante. No tiene reacción cruzada con IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 IL-8, TNFalfa, IFNalfa, IFNgamma o IL-1alfa de ratón.

Calibración:

Los estándares en este ensayo son calibrados en referencia a el NIBSC lote 86/632.

Un (1) pg de estándar Biotrak = 2.5 NIBSC pg.

Reproducibilidad:

Precisión interna del ensayo:

El coeficiente de variación interno de este ensayo de ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Precisión entre ensayos:

El coeficiente de variación entre ensayos de este ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Sensibilidad:

La dosis mínima detectable de (h)IL-1alfa fue determinada por ser de <2pg/ml (0.1 pg/pozo), por adición de 2 desviaciones estándar a la Densidad Óptica del valor del cero y por el cálculo correspondiente de la concentración en la curva estándar.

Paralelismo:

La linealidad de dilución fue determinada por diluciones seriadas de 6 diferentes muestras positivas. Las diluciones fueron ensayadas por ELISA y las dosis “encontradas” fueron graficadas contra las dosis esperadas.

(Tomado del inserto del kit comercial del proveedor).

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral- α) EN SUERO SANGUÍNEO Y SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR LINFOCITARIO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo para medir los niveles de TNF- α tanto en suero como en sobrenadantes de los cultivos celulares realizados, se efectuó con un kit comercial de ELISA (BIOTRAK High sensitivity tumour necrosis factor- α [(h)TNF- α]human, ELISA system code RPN 2788) de Amersham Pharmacia Biotech.

Este inmunoensayo enzimático emplea una técnica cuantitativa tipo sándwich. Donde un anticuerpo específico para (h)TNF tipo alfa humana ha sido fijado a los pozos de la microplaca que provee el kit. Las muestras a las que se les va a determinar el TNF- α son pipeteadas dentro de los pocillos. Si el TNF- α se encuentra presente en las muestras problema, se unirá específicamente a el anticuerpo anti TNF- α inmovilizado en la placa. Un anticuerpo biotinilado es agregado a los pozos, que se unirá al TNF- α de la muestra unido al Ac anti-TNF- α después de la primera incubación. Después de un lavado, donde se eliminan todas las proteínas de la muestra que no se unieron específicamente, se le adiciona un reactivo amplificador Amdex. Cualquier TNF- α que se haya unido tanto al Ac anti TNF- α inmovilizado como al Ac biotinilado se fijará al reactivo de amplificación. Después de la incubación y el posterior lavado para remover todo el exceso de reactivo amplificador, se le adiciona un sustrato que actúa sobre la enzima para que se desarrolle el color en proporción a la cantidad de TNF- α unido en el paso inicial del procedimiento.

NOTA: El *Amdex amplification reagent es el mismo que se utilizó en la técnica para la IL-6.

Metodología de la técnica para TNF- α :

- 1.- Los reactivos y estándares de trabajo para montar la curva de calibración se prepararon siguiendo las indicaciones del kit comercial. (Ver detalles en anexo # 4)
- 2.- Se prepararon todas las tiras suficientes de la microplaca para correr tanto los estándares de trabajo como las muestras problemas.

- 3.-Se corrieron las pruebas **por duplicado**, colocando blancos de reactivo y una curva de calibración con estándares de concentración conocida proporcionados por el kit al mismo tiempo que se corrieron las muestras a analizar.
- 4.-Se pipeteó 100 µl de diluyente estándar en los pocillos del blanco.
- 5.-Se pipeteó 100 µl de cada concentración del estándar para hacer la curva de calibración en los pocillos de la curva estándar.
- 6.-Se pipeteó 100 µl de cada muestra problema (sueros y sobrenadantes) en los pocillos restantes de la microplaca.
- 7.- Se cubrió la microplaca con un plástico adhesivo proporcionado por el kit y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (20-25 °C) con movimientos rotatorios.
- 8.-Se lavaron los pozos por llenado y decantación de los pocillos con una pizeta usando el buffer de lavado proporcionado por el kit. Se repitieron 4 veces los lavados y al final se aspiró el exceso de buffer por inversión de la placa sobre toallas de papel secante.
- 9.-Se pipetearon 100 µl del anticuerpo biotinilado en todos los pozos. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente(20-25 °C) con continuos movimientos.
- 10.- Se repitió el lavado de los pozos como se indica en el paso 8.
- 11.-Se pipetearon 100 µl de reactivo amplificador Amdex en todos los pozos, se cubrió la placa incubándola por 30 minutos a temperatura ambiente y con movimiento continuo.
- 12.- Se repitió el lavado de los pozos como se indica en el paso 8.
- 13.- Se pipetearon 100 µl del substrato TMB dentro de todos los pozos, sin cubrir esta vez la placa incubándola por 1 hora a temperatura ambiente,y con movimiento continuo.
- 14.- Se pipetearon 100 µl de la solución de parada de la reacción enzimática (ácido sulfúrico al 0.18 M) dentro de todos los pozos.
- 15.- Se determinó la densidad óptica de cada pozo a 450 nanómetros de longitud de onda, durante los 30 minutos siguientes de la prueba, usando un lector para ELISAs “Microwell Strip Reader Model EL301” de BIOTEK^R INSTRUMENTS. INC

Diagrama de flujo de la Técnica de ELISA para TNF-alfa

	(blanco) Cero	estándares	muestras
Estándar TNF-alfa	-----	100 µl	-----
Diluyente estándar	100 µl	-----	-----
Muestra	-----	-----	100 µl

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /1 hora
Con movimiento constante

LAVADO
Aspirar/decantar con Buffer
4 veces

Reactivo Anticuerpo Biotinilado	100 µl	100 µl	100 µl
------------------------------------	--------	--------	--------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /1 hora.

LAVADO con buffer /4 veces

Reactivo amplificador Amdex	100 µl	100 µl	100 µl
--------------------------------	--------	--------	--------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /30 min.

LAVADO con buffer /4 veces

SUBSTRATO	100 µl	100 µl	100 µl
-----------	--------	--------	--------

Incubación a $^{\circ}$ T amb. /1 hora.

Solución de Parado de la reacción	100 µl	100 µl	100 µl
--------------------------------------	--------	--------	--------

Determinar la densidad óptica de cada pocillo a una λ de 450 nm dentro de los siguientes 30 min.

INFORMACIÓN ADICIONAL DE LA TÉCNICA:**Especificidad:**

Este ensayo reconoce tanto al TNF-alfa natural como al recombinante. No tiene reacción cruzada con (h) IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 IL-8, TNF beta, IFN gama, IFN beta ni TNF-alfa de ratón.

Calibración:

Los estándares en este ELISA son calibrados en referencia al WHO lote 87/650.

Un (1) pg de estándar Biotrak = 3pg de estándar WHO = 0.12 unidades WHO.

Reproducibilidad:**Precisión interna del ensayo:**

El coeficiente de variación interno de este ensayo de ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Precisión entre ensayos:

El coeficiente de variación entre ensayos de este ELISA ha sido determinado por ser <10%.

Sensibilidad:

La dosis mínima detectable de (h)TNF α fue determinada por ser de 0.1 pg/ml (0.01 pg/pozo), por adición de 2 desviaciones estándar a la Densidad Óptica del valor del cero y por el cálculo correspondiente de la concentración en la curva estándar.

Paralelismo:

La linealidad de dilución fue determinada por diluciones seriadas de 6 diferentes muestras positivas. Las diluciones fueron ensayadas por ELISA y las dosis "encontradas" fueron graficadas contra las dosis esperadas.

Valores esperados de la prueba:

Los niveles normales de (h)TNF α en muestras de suero están en el rango de 0.9 -4.9 pg/ml.

Los niveles normales de (h)TNF α en muestras de plasma están en el rango de 0-1.8 pg/ml.

(Tomado del inserto del kit comercial del proveedor).

VI.- RESULTADOS.

Los resultados se mostrarán de acuerdo al orden de los objetivos particulares planteados al inicio de este trabajo:

1.-Criterios de Inclusión:

El sondeo clínico para establecer los criterios de inclusión y exclusión de los jóvenes de ambas poblaciones analizadas, se hizo a través de una encuesta escrita (que se muestra en el anexo # 6), misma que se aplicó para validar que los sujetos del estudio no hubiesen padecido o padecieran alguna enfermedad que pudiera interferir con el estudio, además se hizo una evaluación del estado general de salud de cada uno de los participantes en el muestreo, efectuando una revisión clínica general (exploración física de órganos vitales, medición de la presión arterial y venosa, revisión de la garganta y oídos, etc.) al momento previo de la toma de la muestra sanguínea. Solo se consideraron aquellos que tenían entre 16 y 21 años de edad, que presentaban buen estado de salud y que no tenían datos hereditarios importantes o de enfermedades padecidas con anterioridad. Originalmente se planeaba trabajar solo con sujetos del sexo masculino, pero por la falta de individuos se incluyeron algunas mujeres que se encontraban en su período hormonal más bajo, de acuerdo al período del ciclo menstrual en que se encontraban. Sin embargo, los resultados de los cultivos celulares de la mayoría de ellas tuvieron índices de estimulación muy bajos con respecto a los de los hombres, por lo que se decidió finalmente eliminarlas del estudio para evitar ruidos de fondo debidos a las diferencias hormonales y/o de sexo sabidas. Los detalles de los datos descriptivos generales del muestreo se describen enseguida:

Tabla 1. Número, porcentaje y lugar del muestreo.

Lugar de muestreo

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Tlajomulco	20	47.6	47.6	47.6
	Guadalajara	22	52.4	52.4	100.0
	Total	42	100.0	100.0	

Figura 4. Porcentajes del lugar del muestreo.

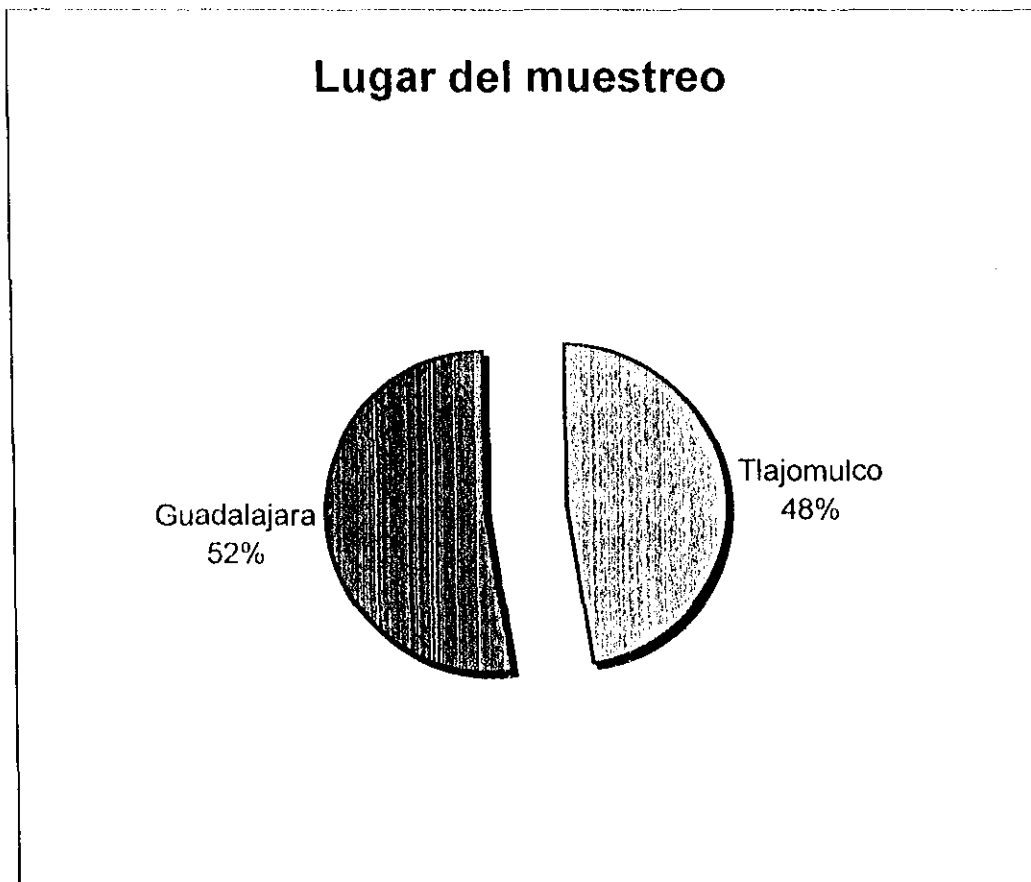


Tabla 2. Distribución de la muestra por género.

Sexo

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Femenino	11	26.2	26.2	26.2
	Masculino	31	73.8	73.8	100.0
	Total	42	100.0	100.0	

Figura 5. Distribución por género.

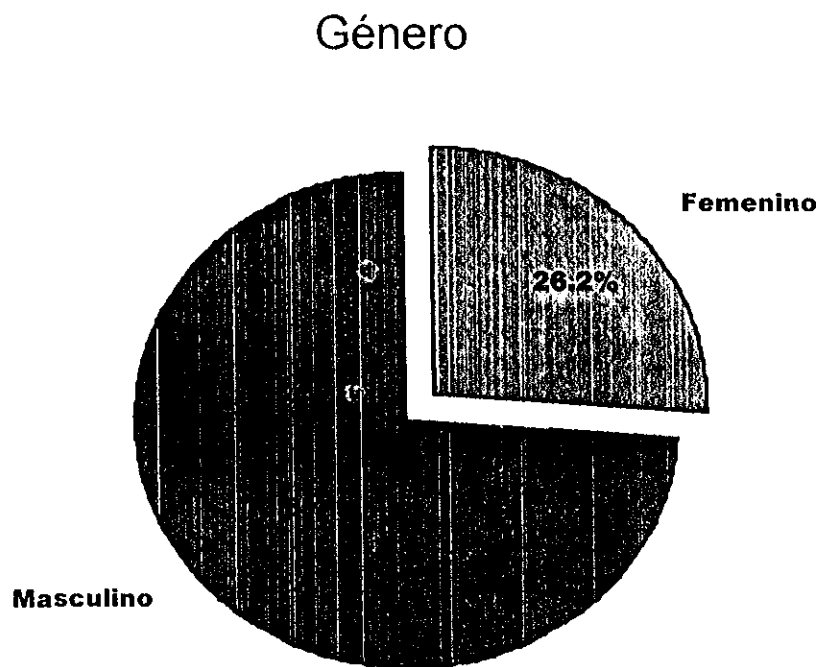


Tabla 3. Distribución de sujetos de estudio por edades.

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Edad	42	16	21	18.17	1.17
Valid N (listwise)	42				

Edad

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	16	2	4.8	4.8	4.8
	17	9	21.4	21.4	26.2
	18	19	45.2	45.2	71.4
	19	6	14.3	14.3	85.7
	20	4	9.5	9.5	95.2
	21	2	4.8	4.8	100.0
	Total	42	100.0	100.0	

Figura 6. Distribución de sujetos de estudio por edades.

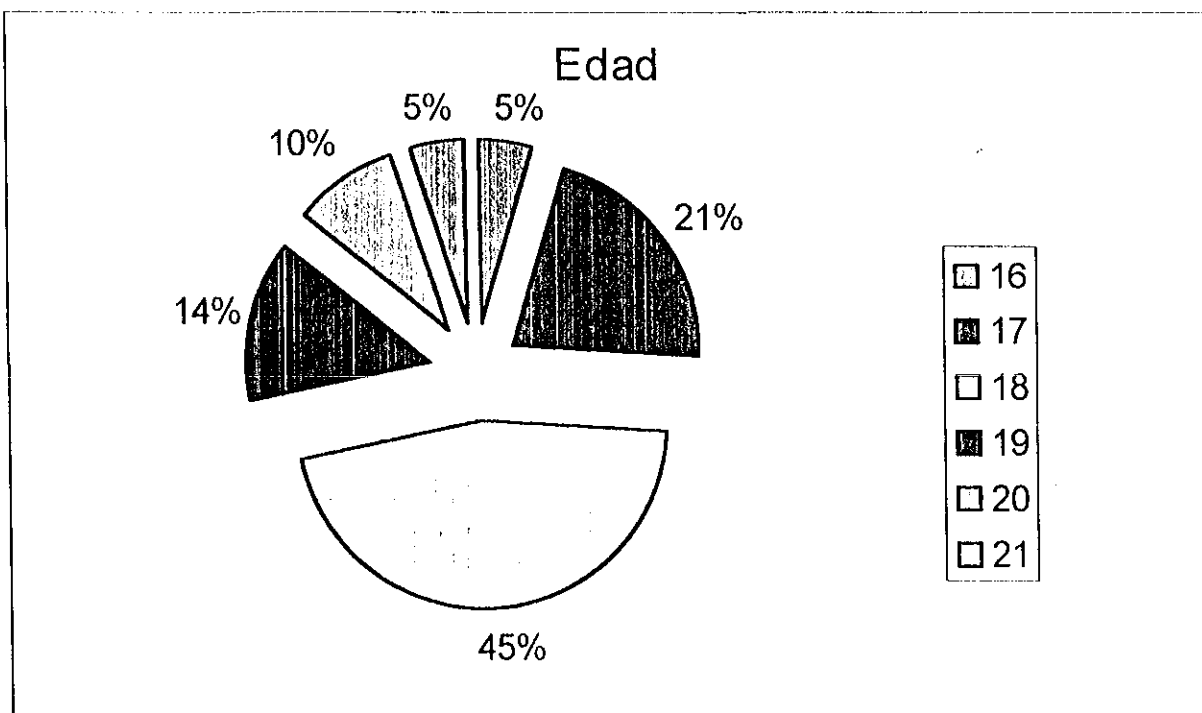


Figura 7. Distribución de los días del muestreo.

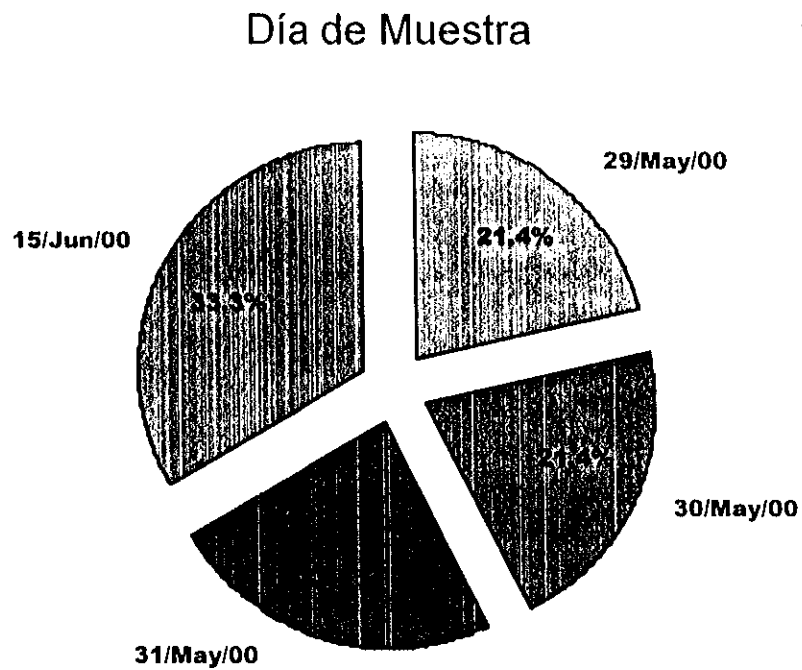


Tabla 4. Distribución de los días del muestreo.

Día de Muestra

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	29/May/00	9	21.4	21.4	21.4
	30/May/00	9	21.4	21.4	42.9
	31/May/00	10	23.8	23.8	66.7
	15/Jun/00	14	33.3	33.3	100.0
	Total	42	100.0	100.0	

2.-Evaluación de la capacidad de proliferación de las células inmunocompetentes (linfocitos) de los grupos en estudio.

Para esta prueba se realizaron ensayos de Linfoproliferación en ambos grupos de estudio. Se utilizó el mitógeno PHA(fitohemaglutinina) a una concentración de 10 µg/ml para la estimulación de la división celular de los linfocitos, midiéndose posteriormente ésta, a través de las cuentas radiactivas por minuto, que luego se tradujeron como Índices de Estimulación (IE). Los resultados de esta determinación se consideran entonces como IE y fueron analizados estadísticamente a través del programa "SPSS 9.0" (Statistic Program Social Science). Se hizo un promedio de los IE de los 4 días del muestreo de cada grupo de estudio. Los promedios fueron muy parecidos, de 14.43 para Guadalajara, con un n= 8 y una desviación estándar de 7.27 y un error estándar de 2.57. Para Tlajomulco el promedio de sus IE fue de 12.8 con una desviación estándar de 6.93 y un error estándar de 2.0 . El análisis de varianza, reveló un nivel de significancia (sig) de 0.618 (P< 0.05) en la prueba de ANOVA. Con un 95 % de confiabilidad, esto indica que no hay diferencias significativas entre los dos grupos de estudio con respecto a este parámetro. Los resultados pueden observarse en la tabla y las figuras siguientes:

Tabla 5. Promedios de los resultados de los cultivos linfocitarios de ambos grupos.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
c.p.m sin PHA	Tlajomulco	12	524.06	110.82	358.6	717.0	0.953
	Guadalajara	8	527.21	122.80	408.5	784.0	
	Total	20	525.32	112.55	358.6	784.0	
c.p.m con PHA	Tlajomulco	12	6640.10	3973.43	1147.03	16914.0	0.651
	Guadalajara	8	7435.62	3478.04	1229.67	11094.6	
	Total	20	6958.31	3709.06	2219.6	16914.0	
I.E. cultivo	Tlajomulco	12	12.8	6.93	4.7	23.5	0.618
	Guadalajara	8	14.43	7.27	5.0	25.7	
	Total	20	13.45	6.92	4.7	25.7	

Figura 8. Comparación de las cpm de los cultivos celulares de ambos grupos.

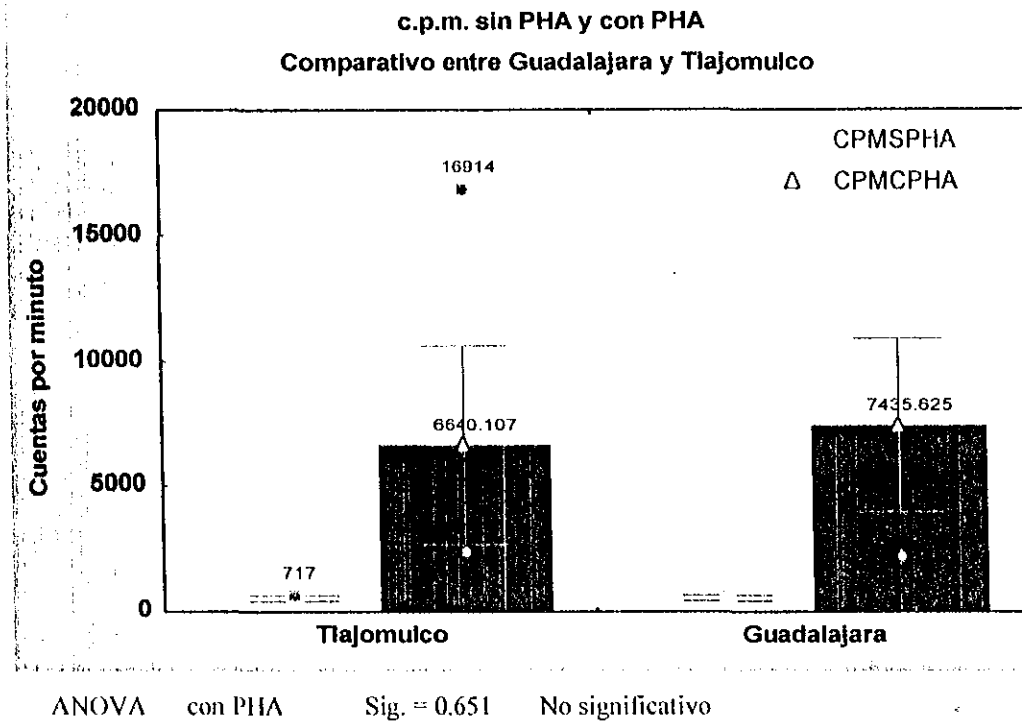
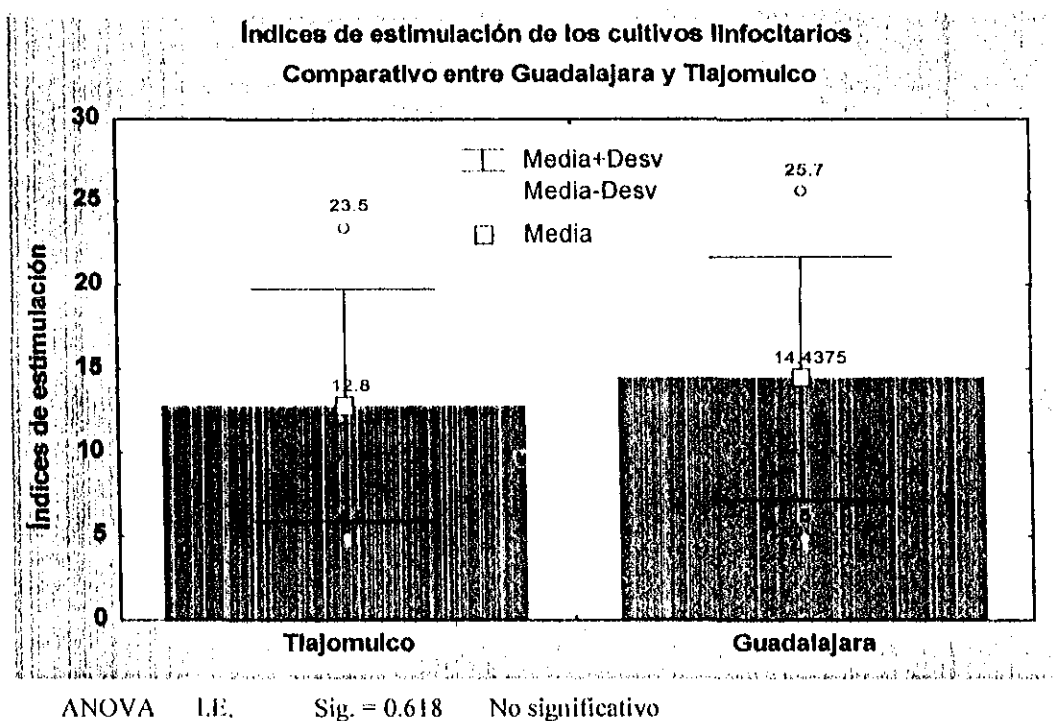


Figura 9. Comparación de los índices de estimulación de los cultivos linfocitarios de ambos grupos.



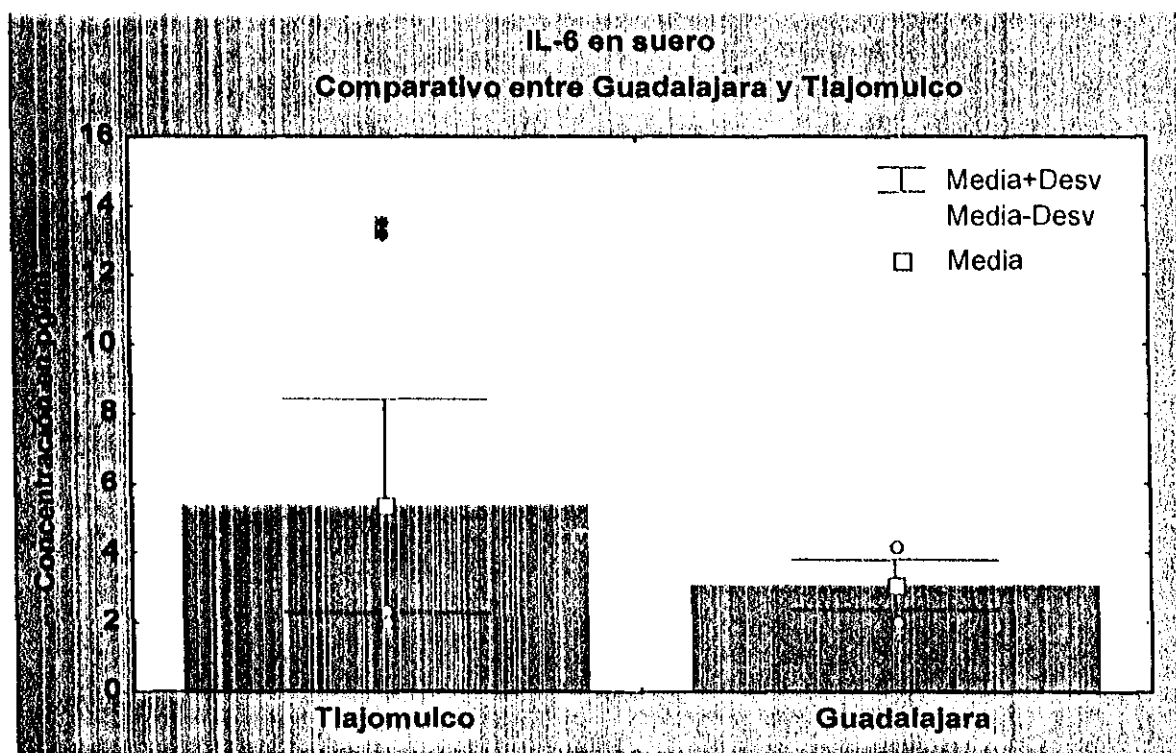
3.-Medición de la IL-6 en los grupos de estudio.

Esta prueba se determinó a través de un ensayo inmunoenzimático ELISA. Se hizo originalmente tanto en suero como en sobrenadante de cultivo en ambos grupos de estudio, pero debido a una falla en los reactivos de un kit utilizado en el primer experimento se invalidaron los resultados de IL-6 en tanto en suero como en sobrenadantes, por lo cual se tuvo que repetir el ensayo en otro día, pero sólo se analizó en sueros debido a la carencia posterior de muestras de sobrenadantes. Los resultados de concentración de los sueros se muestran en pg/ml (picogramos por mililitro) y se analizaron a través de ANOVA, se encontró que no hay diferencias significativas en ambos grupos de estudio, con un nivel de significancia de 0.052 ($P < 0.05$) y con una confiabilidad del 95 %. Los resultados pueden verse en la tabla y figura siguientes:

Tabla 6. Comparación de los promedios de concentración de IL-6 en suero.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
IL-6 suero	Tlajomulco	20	5.345	3.073	2.0	13.6	0.052
	Guadalajara	8	3.088	0.712	2.0	4.2	
	Total	28	4.70	2.803	2.0	13.6	

Figura 10. Comparación del promedio de la concentración de IL-6 en suero .



ANOVA IL-6 en suero Sig = 0.052 No significativo

4.-Medición de la IL-1 α en los sueros de ambos grupos de estudio.

También esta interleucina proinflamatoria fue medida a través de un ensayo Inmunoenzimático de tipo ELISA, se analizaron un total de 18 muestras, 8 de Guadalajara y 10 de Tlajomulco. Los resultados de los promedios de estas mediciones aunque fueron bastante diferentes en cada grupo, no fueron significativos estadísticamente. Estos resultados se muestran en la tabla y figura siguientes. Se observa una tendencia de mayor concentración de IL-1 α sérica en el grupo Guadalajara, aun cuando las diferencias no son significativas.

Tabla 7. Comparación de los promedios de concentración de **IL-1 α** en suero en ambos grupos de estudio.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
IL-1 α Suero (pg/ml)	Tlajomulco	10	1.97	6.22	0.00	19.7	0.162
	Guadalajara	8	23.13	45.42	0.00	120.8	
	Total	18	11.37	31.42	0.00	120.8	

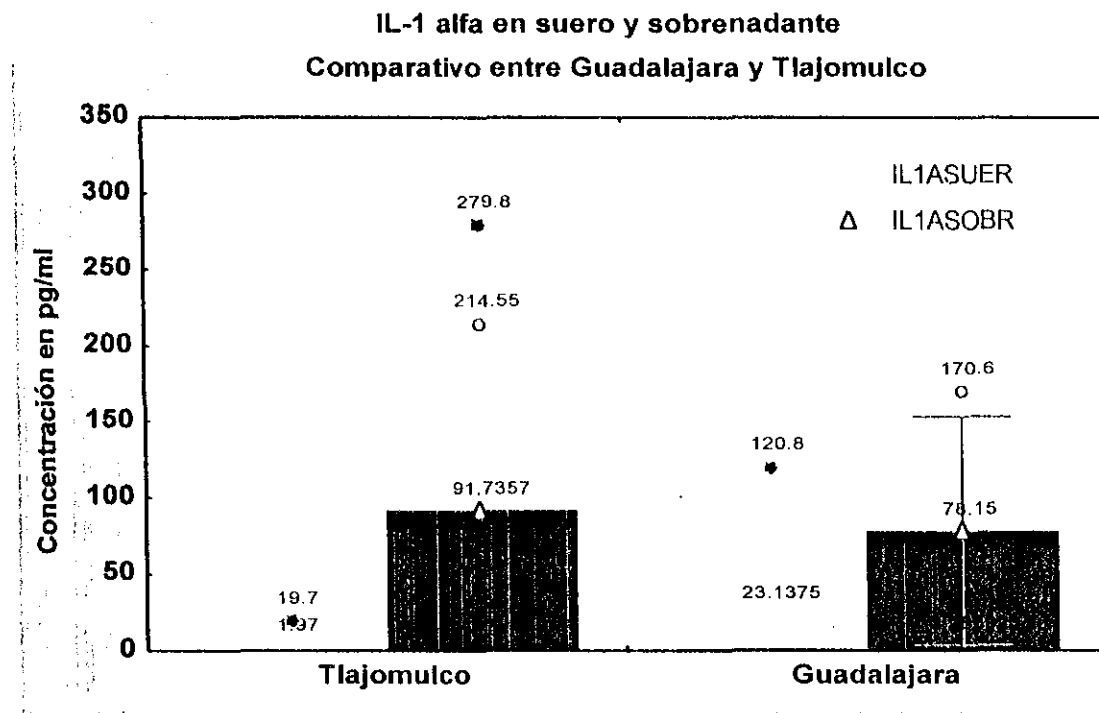
5.-Medición de la IL-1 α en los sobrenadantes de los cultivos linfocitarios de ambos grupos de estudio.

También se midió la concentración de IL-1 α en los sobrenadantes de los cultivos realizados, aunque se tenían al final muy pocas muestras de sobrenadantes debido a su pérdida por el primer ensayo de IL-6. Se analizaron 11 muestras, 7 de Tlajomulco y 4 de Guadalajara, donde los promedios fueron muy similares, así que tampoco se encontraron diferencias significativas en este parámetro inmunológico, ya que en el análisis de Anova hubo una sig = 0.832 ($P < 0.05$). Pueden visualizarse los resultados en el la tabla y figura siguientes donde se muestran en una sola gráfica los dos tipos de mediciones de la IL-1 α (suero y sobrenadante).

Tabla 8. Comparación de los promedios de concentración de IL-1 α en sobrenadantes en ambos grupos de estudio.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
IL-1 α Sobren.(pg/ml)	Tlajomulco	7	91.87	110.85	1.00	279.8	0.832
	Guadalajara	4	78.15	74.86	3.60	170.6	
	Total	11	86.88	95.40	1.00	279.8	

Figura 11. Comparación de los promedios de la concentración de IL-1 α en suero y sobrenadantes de ambos grupos.



ANOVA IL-1 α en suero Sig = 0.162 No significativo
ANOVA IL-1 α en sobrenad. Sig = 0.832 No significativo

6.-Medición de la IL-1 β en sueros de ambos grupos de estudio.

Para esta determinación realizada en el suero de las muestras sanguíneas de la población analizada, también se utilizó la técnica de ELISA con un kit comercial específico para la IL-1 β . En total se analizaron 20 muestras, 8 de Guadalajara y 12 de Tlajomulco. Los resultados fueron negativos en ambos grupos, es decir, la concentración de IL-1 β en el suero de las muestras analizadas fue menor de 1 pg/ml por lo que no fue detectable por este ensayo Inmunoenzimático, cuya sensibilidad es de mínimo esta cantidad, como nos indica el inserto del kit. Se presentan los resultados en la siguiente tabla y se muestra la figura con el gráfico en suero y sobrenadante de la IL-1 β juntos.

Obviamente, no fue posible hacer el análisis de varianza para este analito debido a la negatividad de todas las muestras.

Tabla 9. Comparación de los promedios de concentración de IL-1 β en suero en ambos grupos de estudio.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
IL-1 β Suero.(pg/ml)	Tlajomulco	12	0.00	0.00	0.00	0.00	-----
	Guadalajara	8	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	20	0.00	0.00	0.00	0.00	

ANOVA no se realiza, sin embargo no hay diferencias en ambos grupos.

7.-Medición de la IL-1 β en sobrenadantes en ambos grupos de estudio.

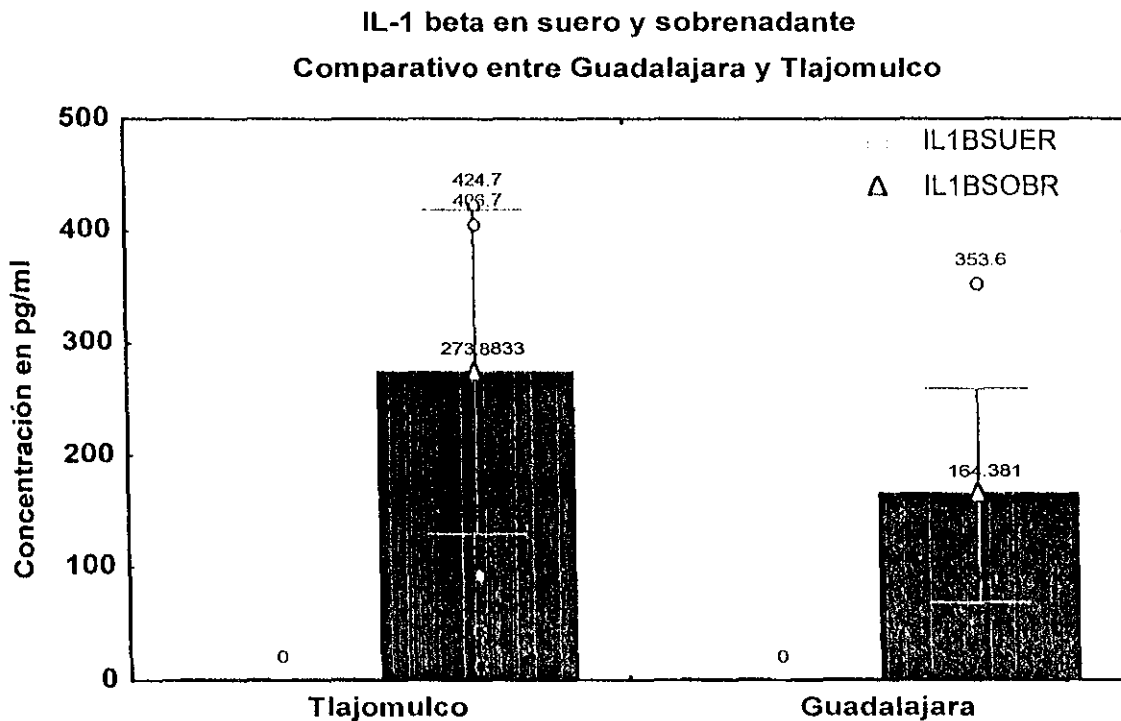
Esta determinación se realizó en el sobrenadante obtenido de los cultivos linfocitarios, utilizando también la técnica de ELISA con un kit comercial específico para la IL-1 β . En total se analizaron 20 muestras, 8 de Guadalajara y 12 de Tlajomulco. Tampoco en este análisis hubo diferencias significativas ya que el nivel de sig. fue de 0.078 ($P < 0.05$).

Se pueden observar los resultados en la tabla y en la figuras siguientes donde se pusieron juntas a la IL-1 β tanto en sobrenadantes como en suero.

Tabla 10. Comparación de los promedios de concentración de IL-1 β en sobrenadantes en ambos grupos de estudio.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
IL-1 β Sobren.(pg/ml)	Tlajomulco	12	273.88	145.14	13.65	428.20	0.078
	Guadalajara	8	164.38	95.66	60.25	353.6	
	Total	20	230.08	136.36	13.65	428.20	

Figura 12. Comparación de los promedios de concentración de IL-1 β en suero y en sobrenadantes en ambos grupos de estudio.



ANOVA para la IL-1 β en sobrenadantes Sig. = 0.231 No significativo.

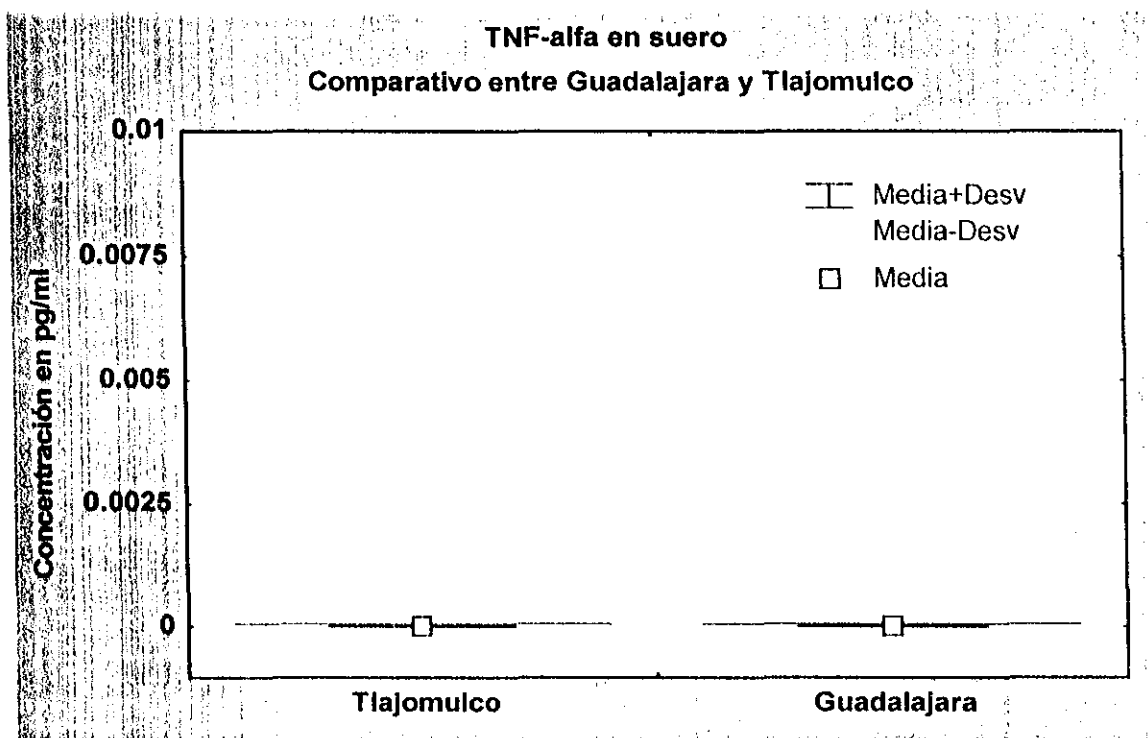
8.-Medición de TNF- α en suero de los cultivos celulares de ambos grupos de estudio:

Esta fue la última medición de parámetros inmunológicos que se realizó. Solo se hizo en suero debido a la carencia de muestras de sobrenadantes de cultivo. Se evaluaron un total de 28 muestras, siendo 20 de Tlajomulco y 8 de Guadalajara. Los resultados fueron negativos en ambos casos, es decir, no hubo concentraciones detectables de este analito. Debido a esta causa no se pudo hacer el análisis de varianza, pero es observable que no hubo diferencias significativas ya que ambos grupos se comportaron igual. Esto se resume en el siguiente cuadro y la figura de la gráfica respectiva:

Tabla 11. Comparación de los promedios de concentración de **TNF α** en **siero** en ambos grupos de estudio.

	Lugar	n	promedio	Desv. Standar	Mínimo	Máximo	Nivel de Signif.
TNF- α Siero.(pg/ml)	Tlajomulco	20	0.00	0.00	0.00	0.00	-----
	Guadalajara	8	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	28	0.00	0.00	0.00	0.00	

Figura 13. Comparación de los promedios de concentración de TNF α en **siero** en ambos grupos de estudio.



No hay diferencias en ambos grupos de estudio.

Los resultados globales entre los parámetros medidos tanto en suero como en sobrenadantes, se muestran en las siguientes gráficas; donde se visualiza que en las mediciones en suero, la IL-1 α se encuentra un poco más elevada en su concentración en las muestras de Guadalajara con respecto de las de Tlajomulco, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

En el caso de la IL-1 β en sobrenadante ocurre el máximo de concentración en Tlajomulco con respecto de Guadalajara, pero sin diferencias significativas y la IL-6 sérica tampoco presenta diferencias significativas en ambos grupos.

Figura 14. Comparación de los promedios de concentración **séricos de IL-1 α , IL-1 β y de IL-6** en ambos grupos de estudio.

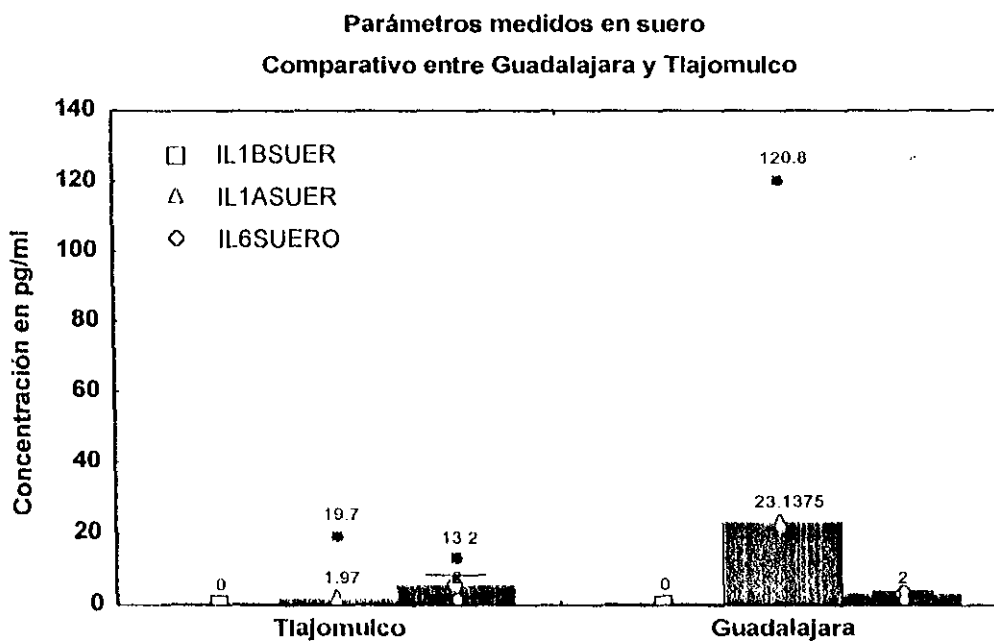
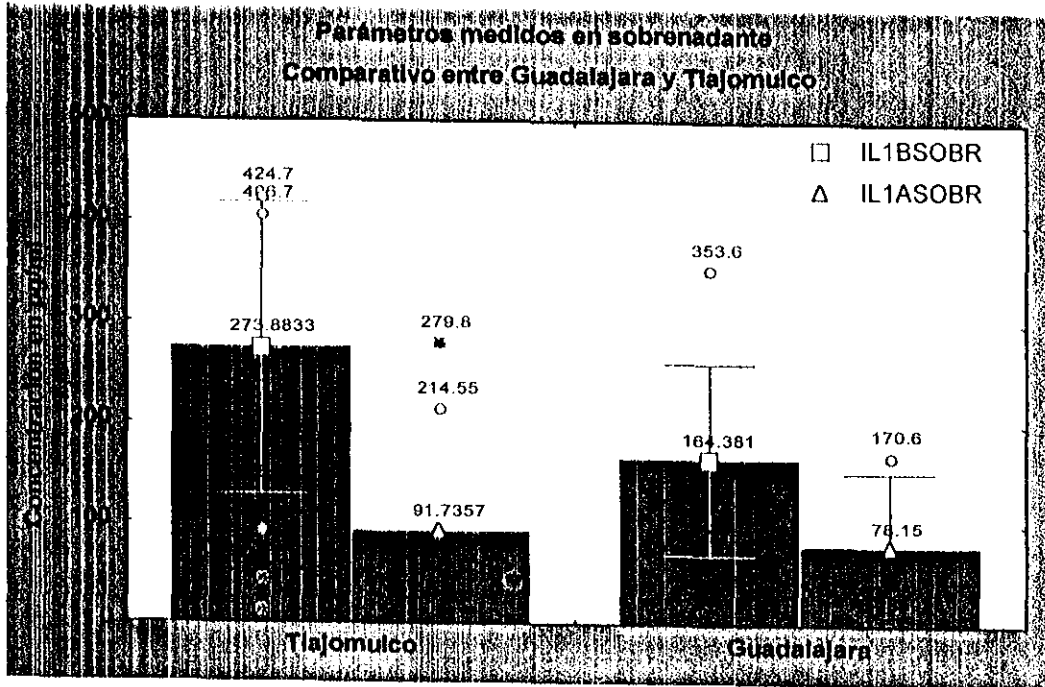


Figura 15. Comparación de los promedios de concentración en sobrenadantes de IL-1 α y de IL-1 β en ambos grupos de estudio.



9.-Análisis estadístico general para comparar ambos grupos de individuos en la observación de todos los parámetros juntos.-

a) Resultados generales de concentración y promedios de todos los analitos juntos.-

Los datos generales de todos los resultados en los parámetros inmunológicos medidos en ambos grupos de estudio se describen en la siguiente tabla:

Tabla 12. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROMEDIOS DE LOS DIFERENTES ANALITOS ENTRE GUADALAJARA Y TLAJOMULCO

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
c.p.m. sin PHA	Tlajomulco	12	524.0642	110.8213	31.9913	358.60	717.00
	Guadalajara	8	527.2125	122.8089	43.4195	408.50	784.00
	Total	20	525.3235	112.5580	25.1687	358.60	784.00
c.p.m. con PHA	Tlajomulco	12	6640.1075	3973.4388	1147.0330	2346.66	16914.00
	Guadalajara	8	7435.6250	3478.0428	1229.6738	2219.60	11094.60
	Total	20	6958.3145	3709.0609	829.3712	2219.60	16914.00
I. E. cultivo	Tlajomulco	12	12.800	6.930	2.000	4.7	23.5
	Guadalajara	8	14.438	7.272	2.571	5.0	25.7
	Total	20	13.455	6.925	1.549	4.7	25.7
IL-1B suero (pg/ml)	Tlajomulco	12	.00	.00	.00	0	0
	Guadalajara	8	.00	.00	.00	0	0
	Total	20	.00	.00	.00	0	0
IL-1B sobren. (pg/ml)	Tlajomulco	12	273.8833	145.1401	41.8983	13.65	428.20
	Guadalajara	8	164.3813	95.6629	33.8219	60.25	353.60
	Total	20	230.0825	136.3697	30.4932	13.65	428.20
IL-1A suero (pg/ml)	Tlajomulco	10	1.9700	6.2297	1.9700	.00	19.70
	Guadalajara	8	23.1375	45.4256	16.0604	.00	120.80
	Total	18	11.3778	31.4222	7.4063	.00	120.80
IL-1A sobren. (pg/ml)	Tlajomulco	7	91.8786	110.8535	41.8987	1.00	279.80
	Guadalajara	4	78.1500	74.8641	37.4320	3.60	170.60
	Total	11	86.8864	95.4068	28.7662	1.00	279.80
IL-6 suero	Tlajomulco	20	5.345	3.073	.687	2.0	13.6
	Guadalajara	8	3.088	.712	.252	2.0	4.2
	Total	28	4.700	2.803	.530	2.0	13.6
TNF-a suero	Tlajomulco	20	.000	.000	.000	.0	.0
	Guadalajara	8	.000	.000	.000	.0	.0
	Total	28	.000	.000	.000	.0	.0

b) La prueba de Homogeneidad de varianza.-

Dado que se deseaba comparar los resultados inmunológicos de ambos grupos, se realizaron pruebas de comparación de medias y para validar dichas pruebas estadísticas, fue necesario probar **la homogeneidad de las varianzas** obteniéndose que en todos, excepto en IL-1 alfa sobrenadante, no existe diferencia significativa en la varianza de ambos grupos de individuos. Esto a su vez podría interpretarse como que los sujetos de estudio son similares en cuanto a sus características fisiológicas generales, es decir que si hubiese alguna diferencia en los resultados de las mediciones obtenidas, éstas son debidas a diferencias exclusivas del estado en que se encuentra el sistema inmunológico y no por diferencias del estado fisiológico general de cada individuo. Las hipótesis planteadas para validar la homogeneidad de las varianzas para cada parámetro inmunológico fueron:

H₀ : σ^2 Guadalajara = σ^2 Tlajomulco Esta H₀ se acepta si Sig > 0.05

H₁ : σ^2 Guadalajara \neq σ^2 Tlajomulco Se rechaza H₀ si Sig < 0.05

Tabla 13. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianza.

Test of Homogeneity of Variances^{a,b}

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
c.p.m. sin PHA	.000	1	18	.992
c.p.m. con PHA	.006	1	18	.937
I. E. cultivo	.042	1	18	.840
IL-1B sobren. (pg/ml)	1.457	1	18	.243
IL-1A suero (pg/ml)	13.722	1	16	.002
IL-1A sobren. (pg/ml)	.917	1	9	.363
IL-6 suero	3.006	1	26	.095

a. Test of homogeneity of variances cannot be performed for IL-1B suero (pg/ml) because the sum of caseweights is less than the number of groups.

b. Test of homogeneity of variances cannot be performed for TNF- α suero because the sum of caseweights is less than the number of groups.

Como la homogeneidad de varianza no se cumple para el analito IL-1 α en suero, donde se puede observar en la tabla anterior que Sig. = 0.002, se realizó una prueba no paramétrica para asegurarnos de si había o no diferencias significativas en las

concentraciones obtenidas, sin embargo, esta prueba confirmó que no había diferencias significativas ni en esta prueba ni en la de ANOVA para este analito. Los resultados de la prueba no paramétrica se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 14. Resultados de las pruebas estadísticas para validar la homogeneidad de IL-1 α sérica.

Ranks				
	Lugar de muestreo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IL-1A suero (pg/ml)	Tlajomulco	10	8.80	88.00
	Guadalajara	8	10.38	83.00
	Total	18		

Tabla 15. Prueba de validación de homogeneidad de IL-1 α

Test Statistics^b

	IL-1A suero (pg/ml)
Mann-Whitney U	33.000
Wilcoxon W	88.000
Z	-.957
Asymp. Sig. (2-tailed)	.338
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.573 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Lugar de muestreo

c) Análisis de varianza de un factor (ANOVA).-

- Para demostrar las diferencias entre ambos grupos, en función únicamente, de la forma en que el sistema inmunológico de los sujetos de cada grupo se altera debido a los diferentes niveles de contaminación al que estaban expuestos, se usó la **técnica de comparación de medias a través del análisis de ANOVA**. Los resultados generales considerando un nivel de confiabilidad de 95 % fueron los que se muestran en la tabla siguiente, considerando que:

H₀ : μ Guadalajara = μ Tlajomulco

Esta H₀ se acepta sig > 0.05

H₁ : μ Guadalajara \neq μ Tlajomulco

H₀ se rechaza sig < 0.05

Tabla 16. Resultados del análisis estadístico para evaluar los niveles de significancia de todos los analitos determinados.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
c.p.m. sin PHA	Between Groups	47.578	1	47.578	.004	.953
	Within Groups	240669.0	18	13370.499		
	Total	240716.6	19			
c.p.m. con PHA	Between Groups	3037671	1	3037671	.212	.651
	Within Groups	2.6E+08	18	1.4E+07		
	Total	2.6E+08	19			
I. E. cultivo	Between Groups	12.871	1	12.871	.258	.618
	Within Groups	898.379	18	49.910		
	Total	911.250	19			
IL-1B suero (pg/ml)	Between Groups	.000	1	.000		
	Within Groups	.000	18	.000		
	Total	.000	19			
IL-1B sobren. (pg/ml)	Between Groups	57555.390	1	57555.390	3.503	.073
	Within Groups	295781.7	18	16432.315		
	Total	353337.1	19			
IL-1A suero (pg/ml)	Between Groups	1991.391	1	1991.391	2.154	.162
	Within Groups	14793.660	16	924.604		
	Total	16785.051	17			
IL-1A sobren. (pg/ml)	Between Groups	479.751	1	479.751	.048	.832
	Within Groups	90544.909	9	10060.545		
	Total	91024.660	10			
IL-6 suero	Between Groups	29.122	1	29.122	4.137	.052
	Within Groups	183.018	26	7.039		
	Total	212.140	27			
TNF-a suero	Between Groups	.000	1	.000		
	Within Groups	.000	26	.000		
	Total	.000	27			

10.-Resultados de los diferentes niveles de contaminación ambiental durante los días del muestreo en ambas zonas de estudio.

Con ayuda de una unidad móvil del laboratorio de química de la atmósfera del Instituto de Meteorología y Astronomía de la U de G, se realizaron mediciones de 5 contaminantes del aire (O_3 , CO, SO_2 , NO_2 y PM_{10}) en Tlajomulco de Zúñiga durante los 4 días de muestreo, y a las mismas horas en que fueron tomadas las muestras sanguíneas, esto es, entre las 9:00 y las 11:00 hrs. Para contrastar con estas mediciones, se consideraron los datos de los mismos 5 contaminantes, determinados a las 10:00 hrs. en la zona centro de Guadalajara por la red de monitoreo de COESE (Comisión Estatal de Ecología). La tabla con los datos que proporcionó el laboratorio de química de la atmósfera del Instituto de Astronomía y Meteorología de la U de G se muestra en el anexo # 6, y en la siguiente tabla se muestran los resultados en concentraciones de IMECAS (Índice Metropolitano de Calidad del Aire) para facilitar su interpretación y análisis.

Tabla 17. Resultados de las concentraciones de distintos contaminantes ambientales determinados durante los cuatro días de muestreo.

DATOS DE CONTAMINACIÓN DE GUADALAJARA Y DE TLAJOMULCO DURANTE LOS DÍAS DE MUESTREO.

Parámetro correspondiente a Tlajomulco	29/05/00	30/05/00	31/05/00	15/06/00	promedio	Según Valores normados
Ozono: O_3	4	18	3	3	7.	Bueno
Monóxido de carbono: CO	3.5	4	3	3.2	3.42	Bueno
Dióxido de Nitrógeno: NO_2	15	10	17	10	13.	Bueno
Dióxido de Azufre: SO_2	4	10	2	3.5	4.87	Bueno
Partíc. menores a 10 micras: PM_{10} mg/m^3	13	16	11	14	13.	Bueno
	imecas	imecas	imecas	imecas		

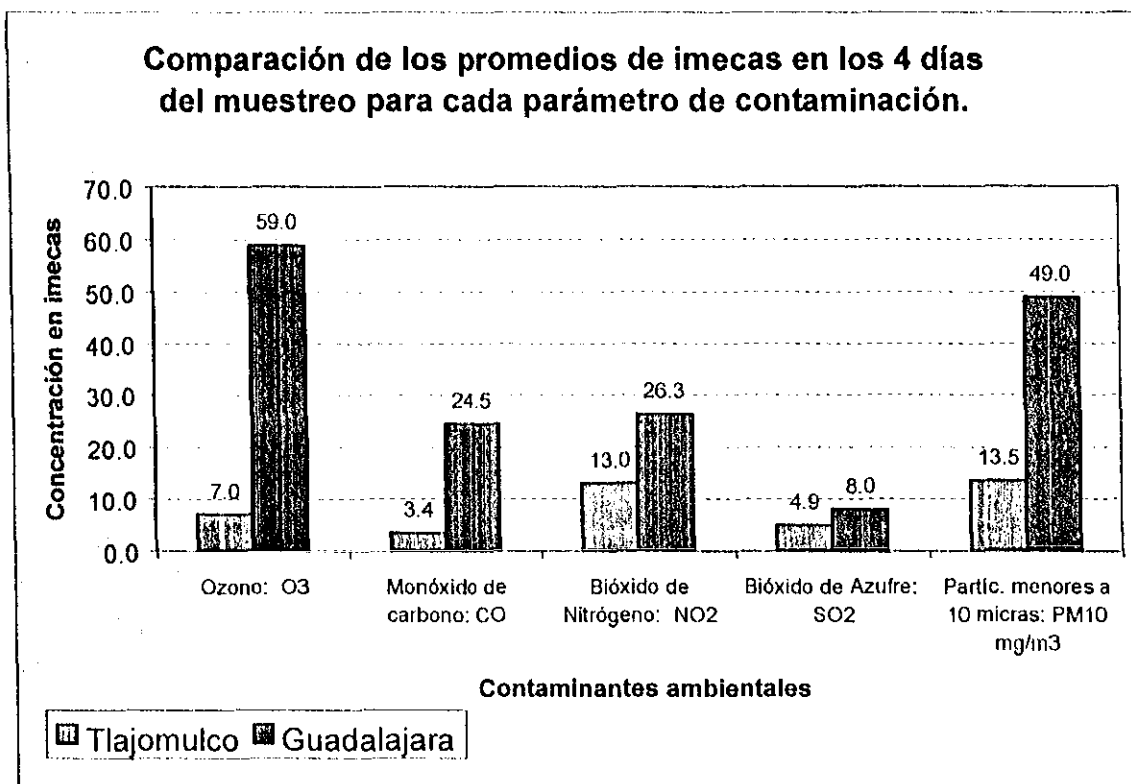
Parámetro correspondiente a Guadalajara	29/05/00	30/05/00	31/05/00	15/06/00	promedio	Según Valores normados
Ozono: O_3		88	41	48	59.	Satisfactorio
Monóxido de carbono: CO	21	29	23	25	24.	Bueno
Dióxido de Nitrógeno: NO_2		26	26	27	26.	Bueno
Dióxido de Azufre: SO_2	11	7	7	7	8.	Bueno
Partículas menores a 10 micras: PM_{10} mg/m^3	60	58	46	32	49.	Bueno
	imecas	imecas	imecas	imecas		

Tabla 18. Estándares de la calidad del aire establecidas por las normas mexicanas.

Estándares de la calidad de aire establecidas por la norma mexicana:	
0 a 50 imecas	Bueno
51 a 100	Satisfactorio
101 a 200	No satisfactorio
201 a 300	Malo
301 a 500	Muy malo

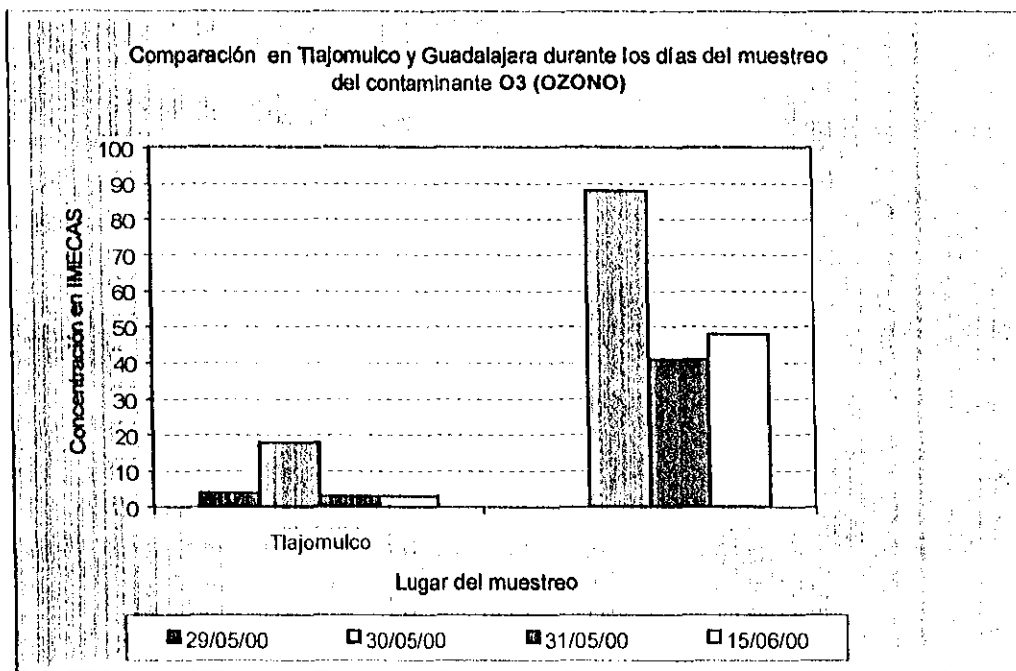
En la siguiente figura se pueden visualizar las diferencias en los promedios de las mediciones durante los cuatro días del muestreo, para cada uno de los 5 contaminantes, comparativamente entre Guadalajara y Tlajomulco:

Figura 16. Comparativo de los promedios de contaminantes de ambas zonas de estudio.



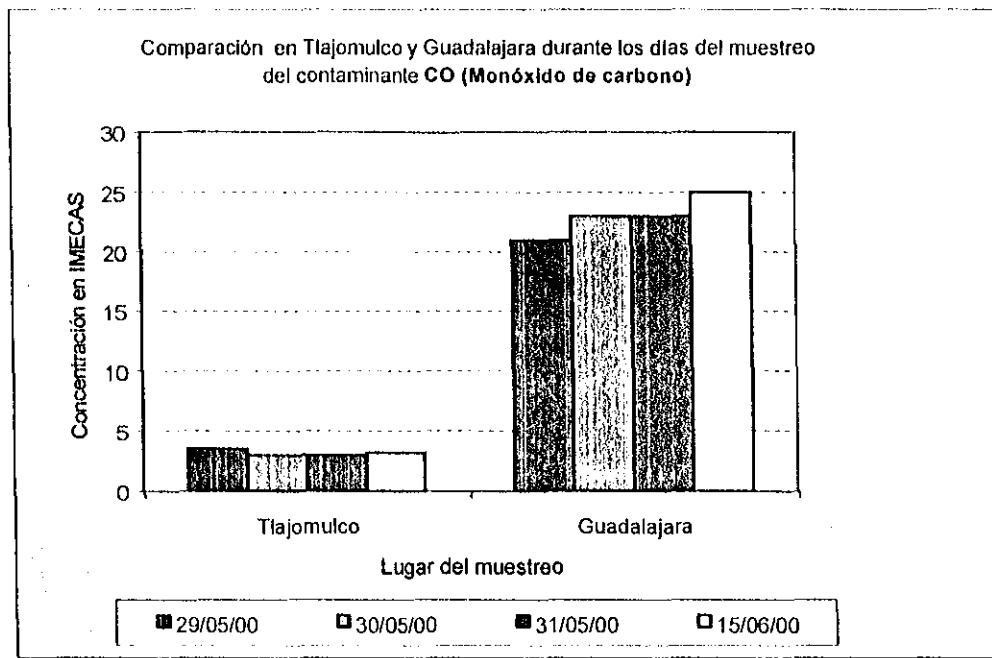
En las siguientes figuras se muestran los datos comparativos de cada región de estudio, analizando contaminante por contaminante:

Figura 17. Comparativo de los niveles de ozono en ambas zonas de estudio.



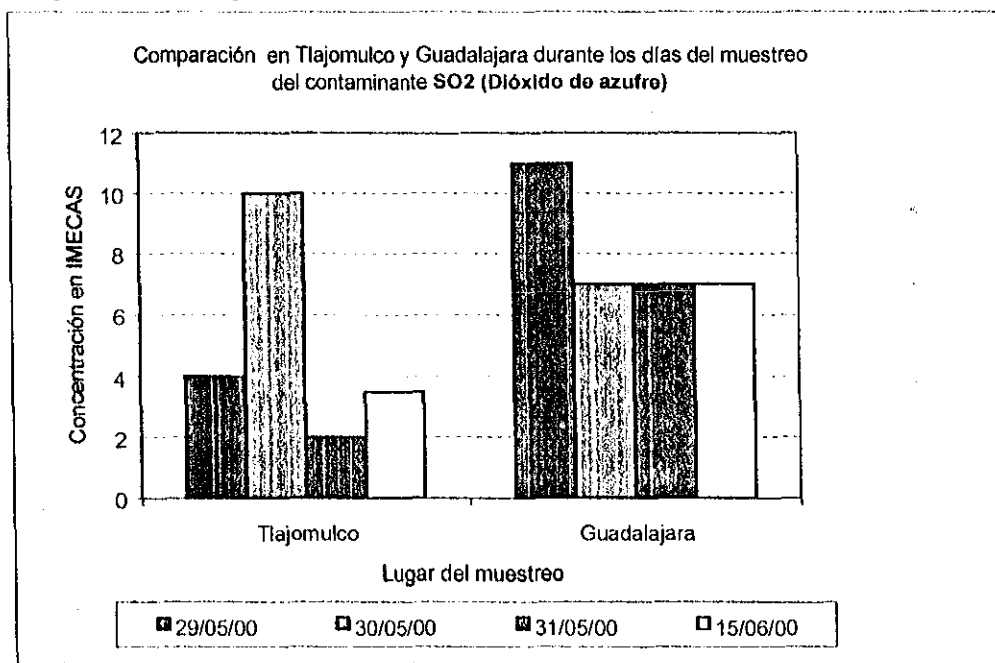
Donde se observa que hay un aumento considerable de ozono en Guadalajara con respecto de Tlajomulco, aun cuando ambos valores de concentración se encuentran dentro del rango de **bueno** (0 a 50 imecas). En Tlajomulco el promedio de los 4 días de muestreo fue de 7.0 imecas y de **satisfactorio** en Guadalajara (de 51 a 100 imecas) donde el promedio fue de 59.0 imecas. Sin embargo, en la figura se observa una tendencia hacia mayores índices de ozono en Guadalajara con respecto de Tlajomulco.

Figura 18. Comparativo de los niveles de CO en ambas zonas de estudio.



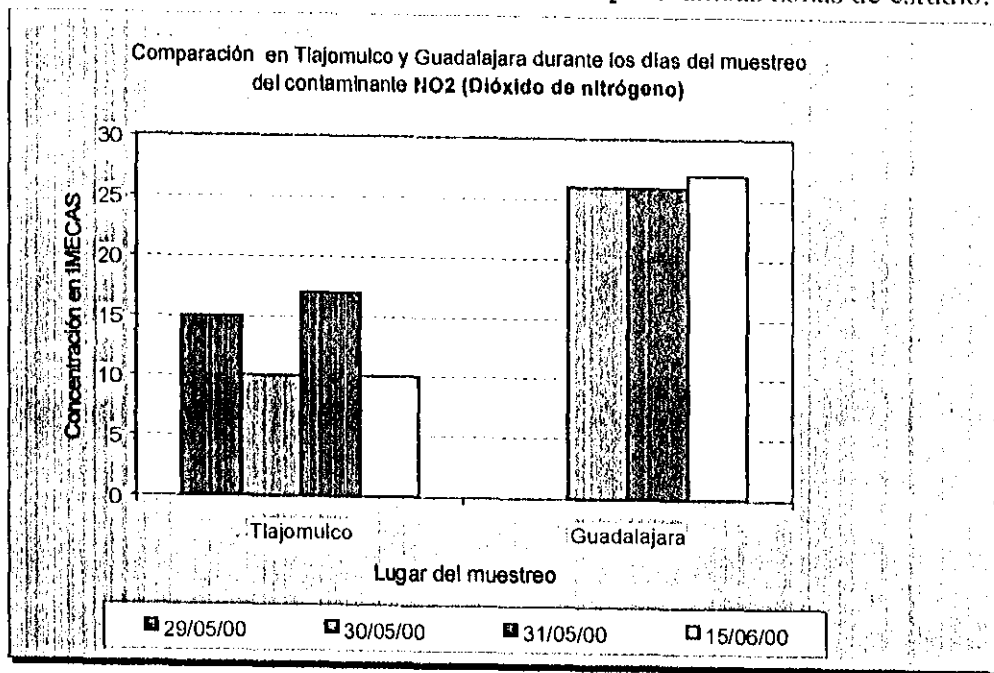
También en el CO se distingue una tendencia hacia mayor concentración en Guadalajara, pero aun así, los niveles de ambos grupos están dentro del rango de calidad de aire buena. Los promedios de concentración de contaminación son de 3.4 y 24.5 imecas en Tlajomulco y Guadalajara respectivamente.

Figura 19. Comparativo de los niveles de SO₂ en ambas zonas de estudio.



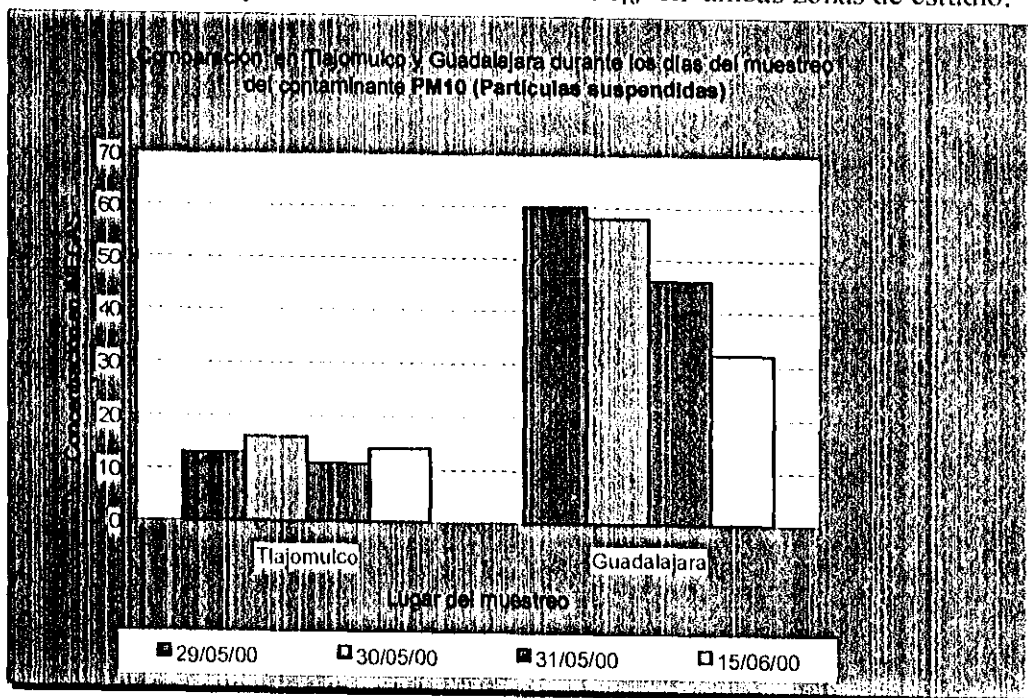
Los resultados de concentración de SO₂ se observan muy parejos en ambos grupos.

Figura 20. Comparativo de los niveles de NO_2 en ambas zonas de estudio.



También en este parámetro existe un cierto grado de homología en cuanto a los niveles de concentración en ambas zonas de estudio.

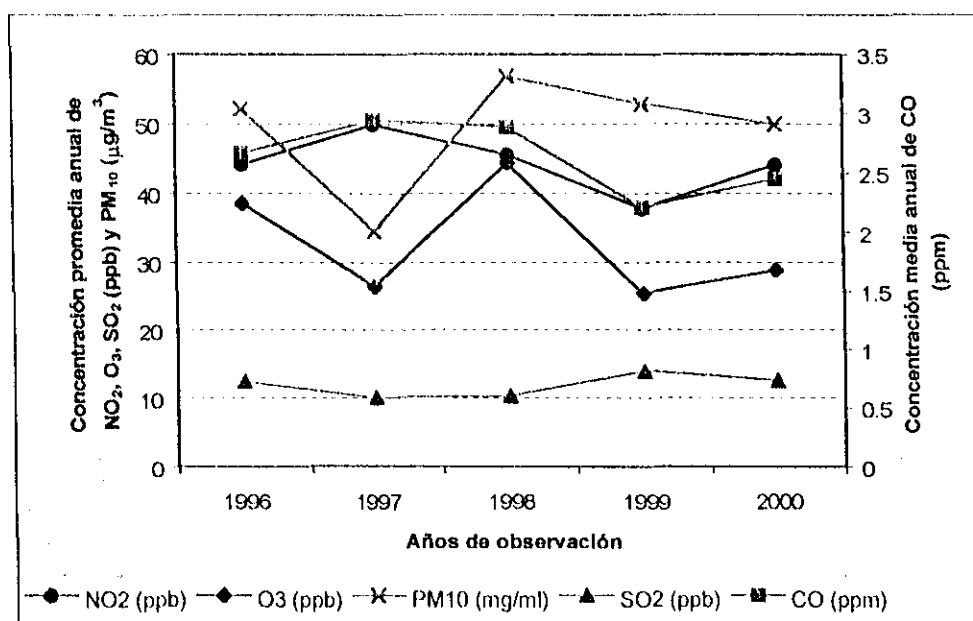
Figura 21. Comparativo de los niveles de PM_{10} en ambas zonas de estudio.



En el caso de las partículas sólidas suspendidas se encontró cierta tendencia hacia valores mayores de contaminación también en Guadalajara, sin embargo ni la concentración por día ni los promedios (de 13.5 y de 49.0 imecas) rebasan los niveles de bueno y satisfactorio.

También se realizó un análisis retrospectivo de la forma en que han estado modificándose los niveles de contaminantes ambientales durante los años 1996 al año 2000, ya que queríamos saber como estaba la contaminación al momento del estudio con respecto de los años anteriores. Los datos son los promedios anuales de cada contaminante por cada año y fueron proporcionados por COESE.

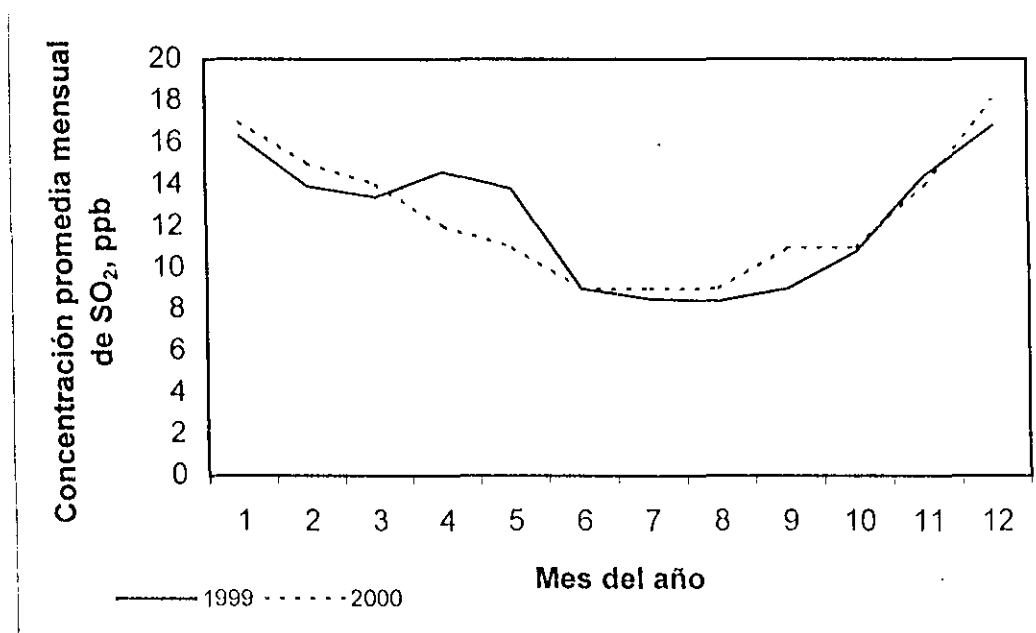
Figura 22. Promedio anual de contaminantes en la zona centro de la ZMG en el período 1996-2000



Se pueden apreciar modificaciones moderadas en los niveles de concentración de cada contaminante, excepto en PM₁₀ y en CO, a pesar de que en general todos parecen tener una tendencia hacia la disminución en el año 2000.

También analizamos la modificación de cada contaminante con respecto del año anterior al del estudio (1999 al 2000) para observar más detalladamente a través de los promedios mensuales durante todo el año los cambios sufridos en la calidad del aire.

Figura 23. Comparativo del SO₂ durante 1999 y 2000.



En esta gráfica se puede observar a detalle, la variación de la distribución del SO₂ durante los años 1999 y 2000. Se aprecia que este contaminante estuvo más bajo en el mes de mayo del 2000, fecha del estudio, que en el año anterior.

En las siguientes gráficas, también puede apreciarse que el NO₂, el SO₂, el CO y el ozono tuvieron una concentración más baja durante el mes de mayo en el año 2000 que en el año anterior.

Figura 24. Comparativo del NO_2 durante 1999 y 2000.

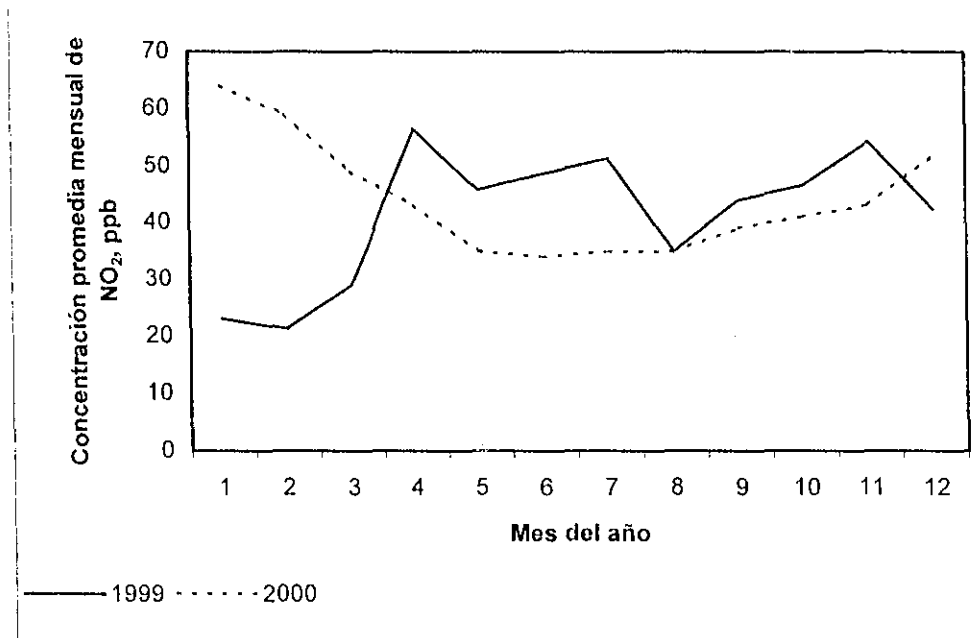


Figura 25. Comparativo del CO durante 1999 y 2000.

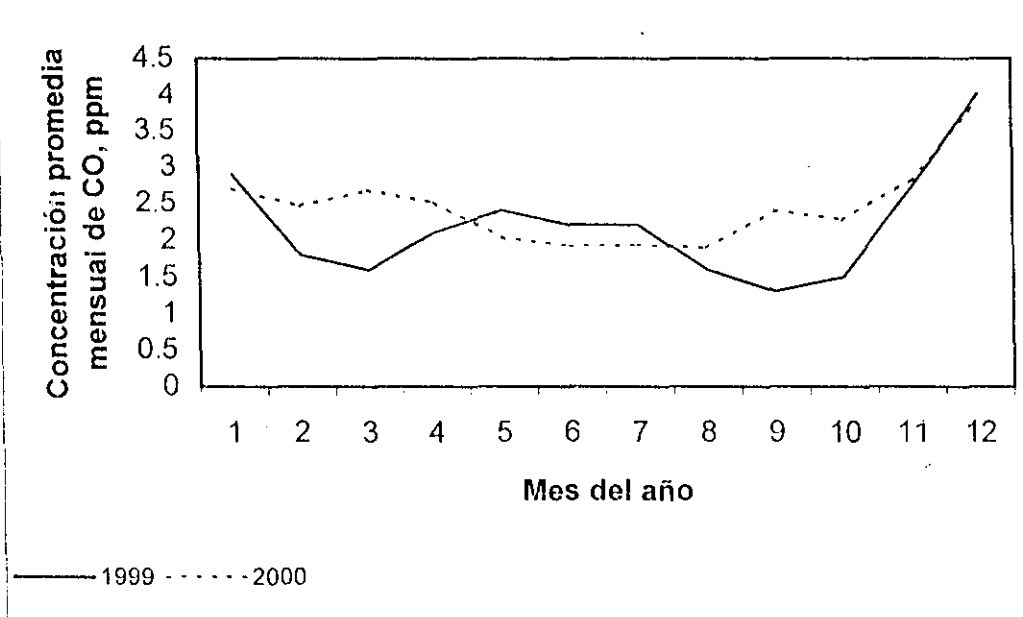
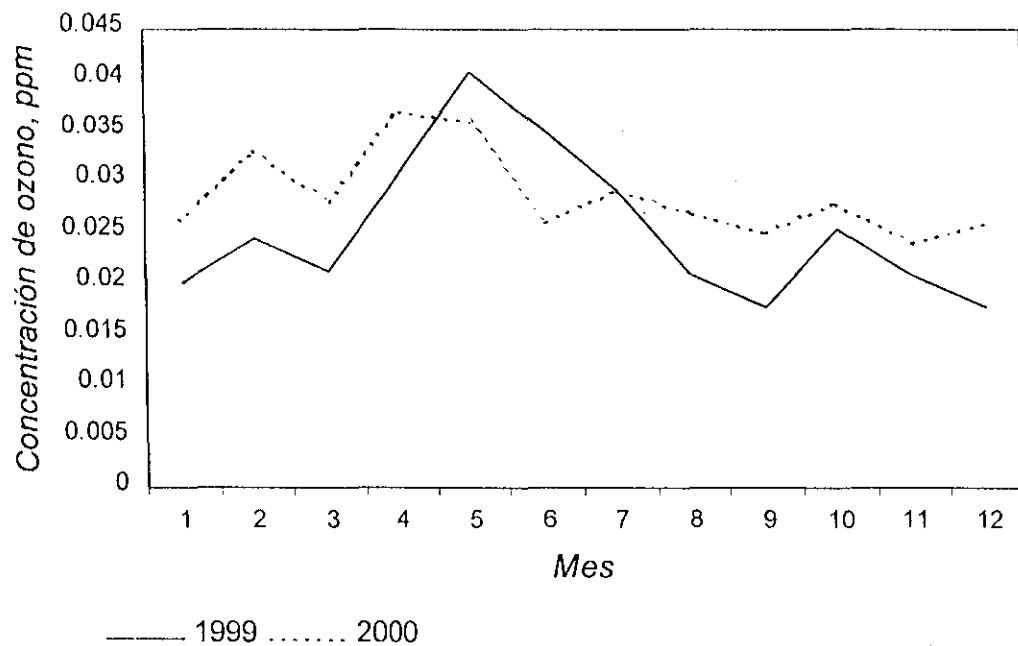


Figura 26. Comparativo del O₃ durante el año 1999 y el 2000

VII.- DISCUSIÓN:

Ensayos de Linfoproliferación.

En el análisis de la forma general en que respondió el sistema inmune de los individuos analizados a través de los cultivos de los linfocitos sanguíneos, se encontraron respuestas muy semejantes en ambos grupos de estudio, como se muestra en la tabla No. 5 y se aprecia en las figuras 8 y 9; lo cual puede indicar que bajo las circunstancias en que se encontraban los sujetos al momento de la obtención de la muestra, la forma en que se activó su sistema inmune era adecuada y además semejante; considerando esto porque los índices de estimulación obtenidos en la mayoría de las muestras se encontraban dentro de los rangos de referencia que se consideran normales. También es importante considerar que los sujetos de estudio eran individuos jóvenes y seleccionados sanos, sin enfermedades respiratorias al momento de la toma de muestra, con estudios previos de biometría hemática y química sanguínea normales. Es necesario notar que al momento de la selección de sujetos para el presente trabajo, del total de individuos potenciales para el estudio, el número de personas excluidas de acuerdo a los parámetros de inclusión considerados, fue mayor en Guadalajara que en Tlajomulco, a razón de 7 excluidos de cada 10 jóvenes de Guadalajara por 2 de cada 10 en Tlajomulco. Lo que podría ser debido a la influencia de los niveles de concentración de contaminantes, entre otros factores estresantes mayores en Guadalajara que en Tlajomulco.

Citocinas determinadas.

En general no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de las citocinas medidas, IL-6, IL-1alfa y beta, TNF-alfa ni séricas ni en sobrenadantes, como se observa en la tabla general no. 12 y que puede notarse en las figuras 8 a la 13; esto puede deberse a las mismas causas por la que no hubo diferencias entre los índices de estimulación, es decir, todos eran sujetos sanos seleccionados; existiendo concordancia con los resultados de los cultivos celulares que indican un sistema inmune estable. En la revisión de la literatura científica al respecto de este tema, varios autores hacen evidente el hecho de que individuos con enfermedades crónicas preexistentes relacionadas con el sistema inmune, son más sensibles a elevar las citocinas proinflamatorias, especialmente la

IL-6 cuando se exponen a determinadas concentraciones de contaminantes atmosféricos (Quay et al, 1998 y Rollhion et al, 2001). Por lo que entonces se observa que al menos en las condiciones en que se llevaron a cabo los trabajos experimentales de esta tesis; no hubo una influencia tan importante de la concentración de los contaminantes ambientales durante el mes de mayo del año 2000 en el sistema inmune de los sujetos sanos bajo estudio.

Los resultados de interleucinas en sobrenadantes de cultivos linfocitarios (figura 15) fue muy pareja en ambos grupos probablemente porque las condiciones de los cultivos de linfocitos fueron idénticas, respondiendo al mismo ambiente que además fue óptimo para las células ya que tenían todos los requerimientos necesarios para proliferar adecuadamente y respondieron igual.

En el caso de la IL-1 α sérica (tabla 7, figura 11) fue el único parámetro donde se observó una cierta tendencia hacia valores mayores para Guadalajara que para Tlajomulco aunque sin ser significativamente diferentes. Esto podría indicarnos una mayor sensibilidad de esta citocina como marcador de respuesta a contaminantes atmosféricos ya que sí fueron mayores las concentraciones de contaminantes en Guadalajara que en Tlajomulco.

La mayoría de los estudios revisados refieren la influencia directa de la expresión de las citocinas marcadoras de inflamación en respuesta a la exposición a los contaminantes atmosféricos directamente sobre las vías respiratorias altas y bajas (Peden, 1997, Wuang et al, 1997; Woodin et al, 1998; Jussila et al, 2001) y han realizado la medición tanto de IL-1, IL-6 y TNF- α sobre los lavados bronquioalveolares y nasales a un tiempo muy inmediato de la exposición con algún o algunos contaminantes determinados, encontrando siempre elevadas significativamente a estas citocinas con respecto de lavados nasales y bronquioalveolares de sujetos que no estuvieron expuestos a contaminantes. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten pensar que probablemente la medición de las citocinas en sangre periférica no resulta tan sensible como lo sería si se midieran directamente en las vías respiratorias altas y bajas, que son las más afectadas por todos los contaminantes del aire, con excepción de la IL-1 α que respondió ligeramente más a los mayores niveles de contaminantes.

Niveles de contaminación medidos.

Los niveles de concentración de contaminantes en la zona centro de Guadalajara se encontraron siempre por encima de los de Tlajomulco durante los días de muestreo (figura 16) lo cual era una situación esperada debido a las grandes diferencias urbanísticas en ambas zonas de estudio, en especial el ozono (figura 17), el monóxido de carbono (figura 18) y las partículas sólidas suspendidas menores a 10 micras (figura 21) se encontraron muy por encima de los niveles de Tlajomulco. Sin embargo es necesario hacer notar que de acuerdo a los valores establecidos por la normatividad mexicana para la calidad del aire, todos los niveles de contaminación aún cuando en Guadalajara estuvieron más altos que en Tlajomulco, caen dentro de los niveles bueno y satisfactorio que se plantea no representan riesgos para la salud de las personas (tabla 18).

Durante los años 1996 a 1999 hubo una tendencia hacia el aumento en la concentración de los contaminantes atmosféricos SO_2 y materia particulada PM_{10} , mientras que el NO_2 , el ozono y el CO bajaron ligeramente su concentración (figura 22). Del año 1999 al 2000 año del presente estudio, los 5 contaminantes analizados se vieron disminuidos así que pudo observarse que los niveles de contaminación, a pesar de lo que se pensaba, no aumentaron durante el año 2000 con respecto de años anteriores, incluso en la mayoría de los parámetros, la concentración disminuyó, como se aprecia en las figuras 23 a la 26 mostradas en los resultados, lo anterior parece ser debido a las medidas ecológicas que se aplicaron a las industrias y al parque vehicular tapatíos (Figueroa, 2001); también se puede considerar que la época del año en la cual fue realizado el estudio, no es la época de mayor concentración de contaminantes, sino más bien esto sucede durante la temporada de invierno, como puede apreciarse en las figuras 23 a la 26, donde también puede apreciarse que el NO_2 , el SO_2 , el CO y el ozono tuvieron una concentración más baja durante el mes de mayo, en el año 2000 que en el año anterior. También esto es una influencia positiva hacia el sistema inmune, que bien pudiera explicar el hecho de no encontrarlo alterado en los individuos estudiados de Guadalajara, por lo que no difieren de los de Tlajomulco que además de todo fueron ambos una población sana y joven.

Desde los años 70, se empezaron a realizar trabajos que señalan la influencia del medio ambiente en la respuesta inmune, por ejemplo Bezedovsky atribuyó una función sensorial al sistema inmune, el cual reaccionó a cambios mínimos suscitados en el interior del organismo producidos como respuesta a las modificaciones de los factores ambientales. En la actualidad se le han atribuido a la mismas citocinas, específicamente a la IL-6, una función importante como mediadora de la inducción de adaptación pulmonar a contaminantes específicos como el ozono, y se considera, basados en estudios experimentales en modelos murinos expuestos a diferentes dosis y tiempos de exposición al ozono, que una simple exposición a este contaminante puede inducir protección o adaptación a los efectos dañinos agudos de posteriores exposiciones al mismo ozono (McKinney *et al*, 1998). Por lo que esta situación podría también estarse dando en la población de Guadalajara, es decir que el sistema inmune se esté adaptando a las condiciones ambientales prevalentes.

En este estudio, los parámetros inmunológicos observados no fueron afectados por el nivel de contaminación predominante en el tiempo del muestreo, por lo que al menos en las condiciones dadas no hay cambios significativos en los grupos de estudio. Sin embargo, se observa una tendencia hacia la elevación de los parámetros que relacionan a los contaminantes ambientales con los marcadores inmunológicos de inflamación, lo que nos puede alertar para considerar que sí se están generando estrategias para evitar el aumento de la contaminación, pero que estas estrategias se deben mantener o inclusive mejorar ya que parece ser que se está justo en los límites de una buena calidad de aire.

VIII.- CONCLUSIONES:

1. En la respuesta proliferativa de los cultivos linfocitarios de ambos grupos de estudio no existen diferencias significativas ya que los linfocitos respondieron a un mismo microambiente en las condiciones de cultivo *in vitro*.
2. En los niveles de concentración de los parámetros inmunológicos IL-6, IL-1 α y β ni en el TNF- α no existen diferencias significativas en los dos grupos estudiados; lo cual sugiere que la calidad de aire fue adecuada durante el año 2000. De tal forma que no afectó de manera importante, el sistema inmune de los jóvenes sanos de la ciudad de Guadalajara considerados en el estudio. Solo hubo una tendencia de la IL-1 α sérica hacia un mayor nivel en Guadalajara, sugiriendo que ésta podría ser un biomarcador inmunológico sensible a las modificaciones del medio ambiente.
3. Los niveles de concentración de los contaminantes atmosféricos analizados CO, SO₂, NO₂, O₃ y PM₁₀ se observaron más elevados en la zona centro de la ciudad de Guadalajara que en la población rural de Tlajomulco de Zúñiga, especialmente las PM₁₀ y el O₃ durante el mes de mayo del 2000, tiempo del estudio, sin embargo ambos niveles se encuentran en el rango de bueno a satisfactorio según la normativa mexicana de calidad del aire.

RECOMENDACIONES.

1. Con base en los resultados obtenidos, se considera que los cultivos linfocitarios no son convenientes de usar como marcadores de respuesta del sistema inmune a las modificaciones ambientales debido que no reflejan la influencia de los contaminantes ambientales por tener un microambiente en las cajas de cultivo siempre idéntico e ideal.
2. Es importante hacer notar que se observó gran heterogeneidad en la comparación de las varianzas con las medias en los resultados de concentración de citocinas séricas, por lo que denotan gran heterogeneidad de las poblaciones muestreadas, así que es posible que el n de las muestras fuera muy pequeño y no fue suficiente para determinar diferencias entre ambos grupos de una manera confiable, por lo que se recomienda repetir el estudio con un número de muestras mayor (30) para cada grupo de población para poder detectar diferencias significativas.
3. La citocina **IL-1 α sérica** podría utilizarse como biomarcador de respuesta inflamatoria por ser una prueba sensible, económica y que requiere poca cantidad de muestra para su realización a diferencia de los cultivos celulares que necesitan casi 10 veces más de muestra.
4. Este tipo de estudio debería realizarse de nuevo, pero con una variable distinta en la que la población de estudio se muestrea al azar, sin seleccionar el estado de salud para que reflejen de una manera más global la forma en que afecta la contaminación a individuos de distintas edades y con distintas condiciones de su sistema inmune.
5. Esta investigación también podría realizarse en diferentes etapas durante el año para observar como se modifican las condiciones de ambiente y de sistema inmune de acuerdo a las modificaciones estacionales y observar si hay una correlación entre estas variables.

6. En general es necesario realizar más investigación para un mejor entendimiento de las interacciones entre los contaminantes ambientales y el sistema inmunológico, con la intención de aumentar el conocimiento de la patogénesis de enfermedades inmunológicas asociadas a la exposición de la contaminación ambiental.

LIMITACIONES.

1. El número de muestras a las que se les hicieron las determinaciones inmunológicas fue muy bajo debido al factor económico que limitó la cantidad de kits de ELISAS para realizar los inmunoensayos.
2. El muestreo no se realizó en la etapa durante la cual los contaminantes ambientales se encontraron más elevados.
3. Se empleó un kit de ELISA para IL-6 que resultó defectuoso y se perdió la muestra que se había analizado con él.
4. La selección de los sujetos de estudio fue muy severa y limitada.

IX.- ANEXOS:

Anexo 1

Preparación de la curva de calibración para la IL-6:

Con los estándares de concentración conocida, suministrados por el kit comercial para la determinación de IL-6, se realizó una curva de trabajo de la manera siguiente:

1. Se marcaron 6 tubos de polipropileno con las concentraciones de 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 pg/ml .
2. Se pipetearon 980 μ l de diluyente estándar del kit dentro del primer tubo, el de 20 pg/ml de concentración.
3. En los tubos restantes se pipetearon 500 μ l del diluyente estándar.
4. Al tubo de 20 pg/ml se le agregaron 20 μ l del estándar de IL-6 reconstituido según las instrucciones de la casa comercial y fue mezclado vigorosamente .
5. Se transfirieron 500 μ l del tubo de 20 pg/ml al de 10 pg/ml y se mezclaron fuertemente.
6. Se repitió esta doble dilución sucesivamente con el resto de los tubos.
7. Se obtuvieron así, por cada 100 μ l de alícuota de cada dilución seriada, 6 niveles de estándar de IL-6 en el rango de 0.63 a 20 pg/ml.

Anexo 2

Preparación de la curva de calibración para la IL-1 β :

Con el estándar de concentración conocida, suministrado por el kit comercial para la determinación de IL-1 β , se realizó una curva de trabajo de la manera siguiente:

1. Se marcaron 6 tubos con las concentraciones de 400, 160, 64, 25.6, 10.24 y 0 pg/ml. Con estos tubos se prepararon diluciones seriadas de 1:2.5 con la siguiente curva.
2. Se pipetearon 240 μ l de diluyente estándar del equipo dentro de cada uno de los tubos.
3. Se agregó 160 μ l del estándar reconstituido dentro del primer tubo, el de 400 pg/ml y se mezcló muy bien.
4. Se agregaron 160 μ l de esta dilución dentro del segundo tubo, el marcado como 160 pg/ml.
5. Se repitieron las diluciones seriadas 3 veces más y se mezclaron fuertemente.
6. Se obtuvo así, una curva estándar de trabajo con concentraciones de 0 pg/ml, 10.24 pg/ml, 25.6 pg/ml, 64 pg/ml, 160 pg/ml y 400 pg/ml.

Anexo 3

Preparación de la curva de calibración para la IL-1 α :

Con el estándar de concentración conocida, suministrado por el kit comercial para la determinación de IL-1 α , se realizó una curva de trabajo de la manera siguiente:

1. Se marcaron 6 tubos para cada punto de la curva estándar con las concentraciones de 400, 160, 64, 25.6, 10.24 y 0 pg/ml. Con estos tubos se prepararon diluciones seriadas de 1:2.5 con la siguiente curva.
2. Se pipetearon 240 μ l de diluyente estándar del equipo dentro de cada uno de los tubos.
3. Se agregó 160 μ l del estándar reconstituido dentro del primer tubo, el de 400 pg/ml y se mezcló muy bien.
4. Se agregaron 160 μ l de esta dilución dentro del segundo tubo, el marcado como 160 pg/ml.
5. Se repitieron las diluciones seriadas 3 veces más y se mezclaron fuertemente.
6. Se obtuvo así, una curva estándar de trabajo con concentraciones de 0 pg/ml, 10.24 pg/ml, 25.6 pg/ml, 64 pg/ml, 160 pg/ml y 400 pg/ml.

Anexo 4

Preparación de la curva de calibración para el TNF α :

Con el estándar de concentración conocida, suministrado por el kit comercial se preparó una solución stock de trabajo que contenía 400 μ l de diluyente estándar y 100 μ l de estándar TNF reconstituido, y con ella se realizó una curva de calibración de la manera siguiente:

1. Se marcaron 6 tubos de polipropileno con las concentraciones de 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, y 10.0 pg/ml .
2. Se pipetearon 980 μ l de diluyente estándar del equipo dentro del primer tubo, el de 10 pg/ml de concentración.
3. En los tubos restantes se pipetearon 500 μ l del diluyente estándar.
4. Al tubo de 10 pg/ml se le agregaron 20 μ l de la solución de trabajo de TNF- α .
5. Se transfirieron 500 μ l del tubo de 10 pg/ml al de 5 pg/ml y se mezclaron fuertemente.
6. Se repitió esta doble dilución sucesivamente con el resto de los tubos.
7. Se obtuvieron así, por cada 100 μ l de alícuota de cada dilución seriada, 6 niveles de estándar de TNF- α en el rango de 0.31 a 10 pg/ml.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E INGENIERIAS

DEPARTAMENTO DE FISICA

INSTITUTO DE ASTRONOMIA Y METEOROLOGIA

LABORATORIO DE QUIMICA DE LA ATMOSFERA

Muestreo de calidad del aire en: Tlajomulco de Zúñiga

Información para la Maestra Ana Cecilia González

Parámetro	29/05/2000 Plaza Tlajomulco	30/05/2000 Plaza Tlajomulco	31/05/2000 Plaza Tlajomulco	15/06/2000 Plaza Tlajomulco
Ozono: O ₃	4 / 0.0044	18 / 0.0198	3 / 0.0033	3 / 0.0033
Monóxido de Carbono: CO	3.5 / 0.455	4 / 0.52	3.0 / 0.39	3.2 / 0.3519
Bióxido de Nitrógeno: NO ₂	15 / 0.0315	10 / 0.02	17 / 0.0357	10 / 0.02
Bióxido de Azufre: SO ₂	4 / 0.0052	10 / 0.0130	2 / 0.0026	3.5 / 0.00455
Partículas menores a 10 micras: PM10 μ gr/m ³	13 / 13	16 / 16	11 / 11	14 / 14
Plomo: Pb	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D.- No detectable

DATOS DE LA COMISION ESTATAL DE ECOLOGIA (COESE) -UBICACIÓN: ZONA CENTRO - HORA: 10:00 AM

Parámetro	29/05/2000	30/05/2000	31/05/2000	15/06/2000
Ozono: O ₃	-	88 / 0.0968	41 / 0.0451	48 / 0.0528
Monóxido de Carbono: CO	21 / 2.730	29 / 3.770	23 / 2.990	25 / 3.250
Bióxido de Nitrógeno: NO ₂	-	26 / 0.0546	26 / 0.0546	27 / 0.0567
Bióxido de Azufre: SO ₂	11 / 0.0143	7 / 0.0091	7 / 0.0091	7 / 0.0091
Partículas menores a 10 micras: PM10 μ gr/m ³	60 / 70	58 / 66	46 / 46	32 / 32
Plomo: Pb	N.D	N.D	N.D	N.D

Datos en IMECA / Concentración (ppm: partes por millón o mg/lt: miligramos por litro) - μ gr/m³: microgramos por metro cúbico

IMECA: INDICE METROPOLITANO DE CALIDAD DEL AIRE.

0 a 50	Bueno	Parámetro (promedio de exposición)
51 a 100	Satisfactorio	O ₃ (1 hora: 0.11 ppm (100 Imecas))
101 a 200	No satisfactorio	CO (8 horas: 11 ppm (100 Imecas))
201 a 300	Malto	NO ₂ (1 hora: 0.21 ppm (100 Imecas))
301 a 500	Muy malo	SO ₂ (24 horas: 0.13 ppm (100 Imecas))
		PM10 (24 horas: 150 μ gr/m ³ (100 Imecas))

Responsable: Ing. Mario Enrique García Guadalupe

CUESTIONARIO

Para el proyecto : " Estudio de la relación de la contaminación atmosférica sobre la respuesta inmune en jóvenes sanos estudiantes de la Preparatoria No 1 de Guadalajara y Preparatoria de Tlajomulco de Zúñiga"

Nombre del participante _____ Grupo _____

Fecha y lugar de nacimiento _____

Domicilio actual _____ Tel _____

Ocupación _____

Ocupación de los padres _____

Número de veces por semana que consume alimentos de origen animal :

Pescado _____ Otras carnes _____ Huevo _____ Lácteos _____

Uso de drogas :

Si _____ No _____ Cuáles _____ Cuánto _____

Tabaquismo :

Si _____ No _____ ¿Cuántos cigarrillos al día ? _____

Práctica de deportes

Si _____ No _____Cuál _____ Con que frecuencia _____

Frecuencia de enfermedades Respiratorias

Por año _____ Duración en días _____

Otras enfermedades que ha padecido en los últimos 3 años .

Amigdalitis _____ Artritis _____ Alergias _____ Infecciones gastrointestinales _____

Otras (descripción breve) _____

Factores predisponentes a estrés : ambiente familiar _____

Ocupación y ambiente del mismo _____ Calidad de el sueño _____

Antecedentes personales y Familiares de importancia _____

Exploración física :

Signos vitales _____ Peso _____ Talla _____ Datos patológicos de algún órgano o sistema _____

X.- BIBLIOGRAFÍA.

1. **Aten J, Bosman C.B., Rozing J, Stijnen T, Hoedemaker P.J, Weening J.J.** Mercury chloride induced autoimmunity in the brown Norway rat: cellular kinetics and major histocompatibility complex antigen expression. *Am. J. Pathol.*, 1988;133:127-38.
2. **Barkhudaryan N; Dunn A.J.** Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with especial reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neurochem. Res.*, 1999 Sep;24(9):1169-80.
3. **Bernaudin JF, Druet E, Druet P, Masse R.** Inhalation or ingestion of organic or inorganic mercurials produces autoimmune disease in rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1981;20:129-35.
4. **Brimblecombe P.** Air composition and chemistry. Cambridge University Press, Cambridge; 1986.
5. **Buzard GS; Kasprzak KS.** Posibles roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000; 19(3):179-99.
6. **Campbell A., Bondy S. C.** Aluminium induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell. Mol.*, 2000 Jun; 46(4):721-30.
7. **Carter JD; Ghio AJ; Samet JM; Devlin RB.** Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997 Oct;146(2):180-8.

8. **Codina Escobar J.C. y Pérez G. A.**, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1993. 25: 250-254.
9. **Cross JT; Benton HP.** The Roles of interleukin-6 and interleukin-10 in B cell hyperactivity in systemic lupus erythematosus. Inflamm. Res.; 1999 May;48(5): 255-61.
10. **Cruse Julius M; Lewis Robert E.** Atlas of Immunology, Edit. Springer-Verlag GmbH &KG, United States of America, 1999;pp185-99.
11. **Davydova B. V. y Skiba Y. N.** Climate of Guadalajara City (México); its variation and change within latest 120 years. World Res. Rev.;1999, 11(2), 258-270.
12. **Davydova B. V., Skiba Y. N., Bulgakov S. N. Y Martínez A.** Modelación Matemática de los niveles de contaminación en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México. Parte I. Microclima y monitoreo de la contaminación. Rev. Int. Contam. Ambient. ; 1999;15 (2) 103-111.
13. **Department of Health Advisory Group on the medical aspects of Air pollution** Episodes:First report –Ozone.London:HMSO, 1991.
14. **Díaz Galindo S.** Geografía general y física del estado de Jalisco. Talleres Gráficos de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara. 1946.
15. **Duffus E.** Toxicología Ambiental. Editorial Omega, 1983; pp. 123-137.
16. **Echarri, L.** Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. Barcelona:Editorial Teide, S.A., 1998; pp. 143-161.
17. **Ershler WB,Séller ET,** Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. Annu. Rev. Med.; 2000; 51:245-270.

18. **Figuroa**, Gaceta universitaria, "Baja la contaminación atmosférica en la ZMG", pp. 12-13, enero de 2001.
19. **Folinsbee L. J.** Human effects of air pollution. *Environ. Health Perspect.* 1993; 100:45-56.
20. **Froen JK; Stray-Pedersen B; Saugstad OD.** Adverse effects of nicotine and interleukin-1beta on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics*, 2000 Apr; 105(4):E52.
21. **García M. E.** Curso de Contaminación en las grandes ciudades. Conferencia magistral, Universidad de Guadalajara-Ecología Estatal. 1997.
22. **González R.** Proyecto piloto para la creación de una normatividad ambiental metropolitana. *Ecología Estatal de Jalisco. Gobierno del estado, Jalisco*; 1995.
23. **Heney, D. y Whicher, J.T.,** *Ann. Clin. Biochem.*, 1995; 32, pp 358.
24. **Hotamisligil G.S.** Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000 Nov; Suppl 4: 23-7.
25. **Huang HY; Wen Y; Krussel JS; Raga F; Soong YK; Polan ML.** Interleukin (IL)-1beta regulation of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001 Mar; 86 (3):1387-93.
26. **Huang H, Meyer KC, Kubai L, Auerbach R.** An immune model of beryllium-induced pulmonary granulomata in mice. *Lab. Invest.*; 1992; 67:138-46.

27. **Imrich A; Ning YY; Koziel H; Coull B; Kobzik L.** Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 1999 Sep 1;159(2):117-24.
28. **Jacoby, W.B., Pastan I.H.** Cell Culture. *Methods in Enzymology*. Academic Press. Inc. San Diego, California; 1979. p. 466-477.
29. **Jussila J; Komulainen H; Hottunen K; Roponen M; Halinen A; Hyvarinen A; Kosma VM; Pelkonen J; Hirvonen MR.** Inflammatory responses in mice after intratracheal instillation of spores of *Streptomyces californicus* isolated from indoor air of a moldy building. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* ; 2001 Feb 15; 171(1):61-9.
30. **Kleeberger SR, Bassett DJP, Jakab GJ, Levitt RC.** A genetic model for evaluation of susceptibility to ozone-induced inflammation. *Am. Rev. Respira. Dis.*, 1993;147:753-60.
31. **Koren H.S.** Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environ. Health. Perspect.*, 1995; 103:235.
32. **Last JA.** Global atmospheric change:potencial health effects of acid aerosol and oxidant gas mixtures. *Environ. Health. Perspect.*,1991;96:151-7.
33. **Laws L. J.**, Aquatic pollution. Editorial. John Wiley & Sons, 1981; pp. 78-83.
34. **MacCarthy MF.** Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol y pentoxifylline. *Med. Hypotheses*, 1999 May; 52 (5): 465-77.
35. **Macdonald NJ, Decorti F, Pappas TC, Tagliatela G.** Cytokine/neurotrophin interaccion in the aged central nervous system. *J. Anat.*, 2000 Nov; 197 (4):543-51.

36. **Mak, W., Ty Simard, J, L.,** Handbook of Immune Response Genes. Plenum Press. New York and London. 1998. pp. 236.
37. **McKinney WJ; Jaskot RH; Richards JH; Costa DL; Dreher KL.** Cytokine mediation of ozone-induced pulmonary adaptation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1998 May; 18 (5):696-705.
38. **Monroy M; Kuluz JW; He D; Dietrich WD; Schleien CL.** Role of nitric oxide in the cerebrovascular and thermoregulatory response to interleukin-1beta. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001 Apr; 280 (4):H1448-53.
39. **Moon C; Becker S.** Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) in outdoor and indoor air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999 Mar 15; 155(3): 245-52.
40. **Ogata A; Nishimoto N; Yoshizaki K.** Advances in interleukin-6 therapy. *Rinsho Byori*, 1999 Apr; 47 (4):321-6.
41. **Peden, D.B.** Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. *Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology, Supplement*, 1997; 52(38): 37-44.
42. **Pope CA. 3rd Bates DV, Raizenne ME.** Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ. Health. Perspect.*, 1995; 103:472-80.
43. **Quay JL; Reed W; Samet J; Devlin RB.** Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1998 Jul; 19(1):98-106.

44. **Rolhion C; Penault-Llorea F; Kemeny JL; Lemaire JJ; Jullien C; Labit-Bouvier C; Finat-Duclos F; Verrelle P.** Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *J. Neurosurg.*, 2001 Jan; 94 (1):97-101.
45. **Schedle A; Samorapoompichit P; Fureder W, Rausch-Fan XII; Franz A; Sperr WR; Slavicek R; Simak S; Klepetko W; Ellinger A; Ghannadan M; Baghestanian M; Valent P.** Metal ion-induced toxic histamine release from human basophils and mast cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998 Mar 15;39(4)560-7.
46. **Schlesinger R,** Pulmonary Immunotoxicity of Ozone: Alterations in Cytokine Metabolism and the Cell Mediated Immune Response, New York University Medical Center, 1998.
47. **Sunyer J. A., Anto J. M., Murillo C., Saez M.** Effects of urban air pollution on emergency room admissions for chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Epidemiol.* 1991; 134:277-286.
48. **Terreni L; De Simoni M.G.** Role of the brain in interleukin-6 modulation. *Neuroimmunomodulation.*, 1998 May-Aug; 5(3-4):214-9.
49. **Wang Z; Larsson K; Palmberg L; Malmberg P; Larsson P; Larsson L.** Inhalation of swine dust induces cytokine release in the upper and lower airways. *Eur. Respir. J.*, 1997 Feb; 10 (2):381-7.
50. **Watt M, Godden D, Cherric J, Seaton A.** Individual exposure to particulate air pollution and its relevance to thresholds for health effects: a study of traffic wardens. *Occup. Environ. Med.*, 1995; 52:790-2.
51. **WHO.** Air Quality Guidelines for Europe. WHO Regional Publications, European Series No. 23, 1987, Copenhagen.

52. **Woodin M A, Hauser R; Liu Y; Smith TJ; Siegel PD; Lewis DM; Tollerud DJ; Christiani DC**, Molecular markers of acute upper airway inflammation in workers exposed to fuel-oil ash. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 1998 Jul;158(1):182-7.
53. **Yudkin JS; Kumari M; Humphries SE; Mohamed-Ali V**. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?. *Atherosclerosis*, 1999 Feb;148(2):209-14.