

Tesis Doctoral

Efectos biológicos de material particulado de origen antropogénico proveniente de la combustión del carbón y de derivados del petróleo

O'Connor, Silvia E.

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en Ciencias Biológicas de la
Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

O'Connor, Silvia E.. (2004). Efectos biológicos de material particulado de origen antropogénico proveniente de la combustión del carbón y de derivados del petróleo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3768_OConnor

Cita tipo Chicago:

O'Connor, Silvia E.. "Efectos biológicos de material particulado de origen antropogénico proveniente de la combustión del carbón y de derivados del petróleo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3768_OConnor

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS BIOLÓGICOS DE MATERIAL PARTICULADO
DE ORIGEN ANTROPOGÉNICO PROVENIENTE DE LA
COMBUSTIÓN DEL CARBÓN Y DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO**

Autor: Lic. Silvia E O'Connor
Director: Dra. Beatriz Molinari

3768

Departamento de Radiobiología
Comisión Nacional de Energía Atómica

2004

University of Buenos Aires
School of Natural Science

DOCTORAL THESIS

**BIOLOGICAL EFFECTS OF ANTROPOGENIC PARTICULATE
MATTER GENERATED FROM COAL AND PETROLEUM
DERIVATES COMBUSTION**

Author: Lic. Silvia E O'Connor
Mentor: Dra. Beatriz Molinari

Radiobiology Department
Nacional Comisión of Atomic Energy

2004

A mis padres

INDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

INTRODUCCION

SECCION I

CONTAMINACION DEL AIRE

1-COMPONENTES DEL AIRE CONTAMINADO.	1
2-MATERIAL PARTICULADO (MP).	4
2.1 Características	4
2.2-Niveles de MP aceptados mundialmente	7
2.3-Efectos sobre la salud	8
2.4-Metodologías experimentales utilizados para la evaluación de los efectos biológicos generados por M	9
2.5-Contaminación del aire con MP en la República Argentina	11
3-MATERIAL PARTICULADO UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO.	14
3.1-MP obtenido a partir de la combustión del carbón.	14
3.2-MP obtenido a partir de la combustión de derivados del petróleo.	16

SECCION II:

IMPACTO BIOLÓGICO DEL MP

1-LOS PULMONES Y LAS VIAS AEREAS SUPERIORES	18
1.1-Estructura básica pulmonar	18
1.2-Alvéolos pulmonares	18
2- TRÁNSITO DEL MP EN EL APARATO RESPIRATORIO.	20
2.1.- Depósito.	20
2.2- Depuración	22
3-EFECTOS BIOLÓGICOS DEL MP	25
3.1-Componentes del MP responsables de los efectos biológicos.	25
3.1.1-Tamaño	26
3.1.2-Composición química	27

3.2-Efectos biológicos del MP utilizado en este estudio.	28
4-INFLAMACION AGUDA	30
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	
SECCION I	
MATERIAL PARTICULADO	
1. Origen y muestreo del MP	40
1.1- MP obtenido a partir de la combustión del carbón.	40
1.2- MP obtenido a partir de la combustión de derivados del petróleo	41
2- Caracterización del MP.	43
2.1- Difracción de Rayos X	43
2.2- Microscopía electrónica de Barrido y EDX	44
SECCION II	
ENSAYOS BIOLOGICOS	
1- Animales	45
2- Estudios <i>in vivo</i>	45
2.1- Preparación del MP.	45
2- Instilación intra-traqueal (IT)	45
2.3- Lavado bronco-alveolar (BAL) y recuento diferencial de células	46
3- Estudios <i>in vitro</i>	47
4- Determinaciones	48
4.1- Viabilidad celular	48
4.2- Parámetros bioquímicos	49
4.3- Citoquinas	49
5- Funciones de defensa de los MA	52
6- Análisis estadístico	54

RESULTADOS

SECCION I
MATERIAL PARTICULADO

1- Caracterización físico-química del MP	55
1.1- MP obtenido a partir de la combustión de carbón: CFA.	55
1.2- MP obtenido a partir de la combustión de derivados del petróleo.	65
1.2.1- Coque	65
1.2.2- MP de origen urbano	73

SECCION II
IMPACTO BIOLÓGICO DE LOS CONTAMINANTES DEL AIRE.

1- Efectos biológicos del MP obtenido a partir de la combustión de carbón: CFA	74
1.1- Efectos <i>in vivo</i>	74
1.2- Efectos <i>in vitro</i>	86
2- Efectos biológicos del MP obtenido a partir de la combustión de derivados del petróleo	91
2.1- Efectos <i>in vivo</i> .	91
2.2- Efectos <i>in vitro</i> .	104

DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES	118
REFERENCIAS	121

AGRADECIMIENTOS

A Betty, mi directora, por haber confiado en mí, por haberme permitido trabajar con libertad y por haberme apoyado y estimulado en el desarrollo de este trabajo.

A la gente del Grupo de Monitoreo Ambiental (UA Química) especialmente a Darío Gómez por su confianza y por las ideas que me ha dado y a Laura Dawidowski.

A Ian Gilmour, por haberme brindado la oportunidad de ir a su laboratorio y a la gente de su lab. especialmente a Colin, Mary, Liz, Pramila e Inés por su generosidad y su afecto.

A Griselda Polla (UA Física), por su ayuda con los estudios de Difracción de Rayos X.

A Mariana Rosenbufch por su ayuda con las microfotografías electrónicas y los EDX

A Marisa, por su ayuda con las mediciones de TNF- α y por sus consejos.

A Deborah por haberme enseñado a trabajar con macrófagos alveolares y por los momentos que compartimos.

A Erica y Anita, por su amistad.

A Mónica, por su generosidad y su constante animo y afecto.

A María Teresa, Gisele, Omar y María por sus constantes muestras de cariño y por sus consejos.

A Mandy por su constante afecto y su apoyo.

A Eugenia por su disposición a prepararme el material y por sus charlas y su compañía.

A la gente de la División Patología con la que compartí todos estos años, en particular al Dr Cabrini, a Mariel, a Marcos, a Santiago y a Andrés por su ayuda con los análisis de imágenes.

A mis primas Mariela y Silvina.

A mi hermano y su familia.

A Susana por ayudarme a transitar etapas difíciles de mi vida.

A Javier y su familia por el cariño y el apoyo constante que me han brindado.

RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos han descrito una asociación entre aumentos de mortalidad y morbilidad humana con la existencia de niveles elevados de material particulado (MP) en el aire.

El tamaño y las características físico-químicas del MP se encuentran íntimamente relacionados con su origen y con los procesos que lo generaron. El MP proveniente de combustiones antropogénicas, como la generación de energía y la actividad industrial y urbana, presenta una gran proporción de partículas *fine* ($d_{ae} < 2.5 \mu m$) y *ultrafine* ($d_{ae} < 1 \mu m$), mientras que el MP de origen natural presenta una mayor proporción de partículas *coarse* ($d_{ae} < 10 \mu m$). Si bien existen dispositivos de control para reducir las emisiones de MP, éstos son ineficientes para retener partículas muy pequeñas y no se encuentran disponibles en muchas partes de nuestro país.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los efectos pulmonares agudos del CFA (proveniente de la combustión del carbón para la generación de energía eléctrica, con bajo contenido de carbono), se encuentran inversamente relacionados con el tamaño de las partículas y están asociados a un incremento en el contenido de azufre, de cuarzo y de trazas de elementos.

Por otra parte, MP obtenido luego de un episodio de emisión accidental industrial (coque, proveniente de la combustión de derivados del petróleo, con alto contenido de carbono) generó efectos pulmonares agudos considerables y disminución en la funciones de defensa de macrófagos alveolares. Los efectos del coque crudo son más pronunciados que los del coque calcinado, indicando una posible participación de los compuestos orgánicos adsorbidos a la matriz carbonosa en el primero. La muestra urbana (Ciudad de Buenos Aires) produjo efectos menores que las muestras de coque.

Dado que las vías aéreas constituyen la ruta de entrada de los contaminantes del aire al organismo, el conocimiento de los posibles efectos nocivos de los

mismos es muy importante para incrementar las medidas de control en ciertas áreas relacionadas con las actividades humanas.

PALABRAS CLAVE: MATERIAL PARTICULADO, CONTAMINACIÓN DEL AIRE, INFLAMACION, VÍAS AÉREAS, MACRÓFAGOS

ABSTRACT

Many epidemiologic studies have identified an association between human mortality and morbidity with high air particulate matter (PM) levels.

Biologic PM responses are closely related to its physicochemical characteristics and its size. Anthropogenic PM from combustion sources, such as electric power generation and industrial and urban activities, are rich in *fine* particles ($d_{ae} < 2.5 \mu\text{m}$) and *ultrafine particles* ($d_{ae} < 1 \mu\text{m}$), while PM from natural sources have got a great proportion of *coarse* particles ($d_{ae} < 10 \mu\text{m}$). Control devices for reducing PM emissions are ineffective in trapping small particles. Besides, they are not available in many parts of our country.

Our results indicate that acute pulmonary effects following intratracheal instillation of Coal Fly Ash (CFA-coal combustion product emitted by electric power plants, with low carbon content) are inversely related to particle size and associated with the increase in sulfur, quartz and trace metal content.

On the other hand, PM obtained as a result of an accidental emission by an industrial facility (coke with high carbon content) generated *in vivo* significant acute pulmonary effects and impairment of alveolar macrophages host defenses. As the effects of raw coke were more pronounced than those of calcined coke, the organic fraction adsorbed to the carbonaceous core of raw coke might play a role in these inflammatory effects. The urban PM sample (from Buenos Aires city) exerted inflammatory effects to a lesser degree than coke particles.

Because PM reaches the human body through the airways but can spread throughout, it is important to study its biological and health effects, with a view to controlling its emission in certain areas of human activity.

KEY WORDS: PARTICULATE MATTER, AIR POLLUTION, AIRWAYS, INFLAMMATION, MACROPHAGES

ABREVIATURAS

BAL-Lavado bronco-alveolar

BALF-Fluido del BAL

CB-Carbon Black (Negro de humo)

CBP (*Carbon Black Pelletizado*)

CBF (*Carbon Black Fluffy*)

CFA-Coal Fly Ash (cenizas de la combustión del carbón)

DEP- Diesel Exhaust Particles (partículas de la combustión del diesel)

DRX-Difracción de Rayos X

DMTU-Dimetil tiourea

EDX-Energía Dispersiva de Rayos X

IL-6-Interleuquina 6

ip-Intraperitoneal

IT-Instilación Intratraqueal

LPS-Lipopolisacárido

L-NAME- N (G)-nitro arginina metil ester

MA-Macrófagos alveolares

MP-Material Particulado

-MP C (*Coarse- C-Guesa*)

-MP F (*Fine -F-Fina*)

-MP UF (*Ultrafine -UF-Ultrafina*)

mg/Kg= mg/Kg de peso

MIP-2- Macrophage Inflammatory Protein- 2

PBS-Solución Buffer Fosfato

PMN-Polimorfonucleares

ROS-Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas del Oxígeno)

TNF- α -Factor de Necrosis Tumoral α

INTRODUCCIÓN

SECCIÓN I: Contaminación del Aire

El término *contaminación del aire* se refiere a la presencia en la atmósfera de una o más sustancias sólidas, líquidas y/o gaseosas producidas directa o indirectamente por el hombre en cantidades tales que afectan adversamente a los seres vivos. La cantidad y la variedad de las sustancias consideradas contaminantes del aire han ido aumentando a lo largo de los años.

-CONTAMINACIÓN EXTERIOR

Proviene de la combustión de carbón y petróleo producidos principalmente por las centrales eléctricas, las calderas industriales y la combustión de la gasolina en los motores de los vehículos.¹

-CONTAMINACIÓN INTERIOR

Se produce en las viviendas por la emisión doméstica de productos derivados de la combustión de gas, queroseno, carbón y madera, utilizados principalmente para calefaccionar y cuya combustión libera monóxido de carbono, dióxido de carbono y material particulado (MP).²

Otras fuentes de contaminación interior son: la combustión del tabaco, la utilización de pinturas, ceras, productos de limpieza, ciertos materiales de la construcción (asbestos), la emisión de radón y la presencia de contaminantes de origen biológico (bacterias, ácaros domésticos, polen, etc).

Esta clase de contaminación es frecuente en los países en desarrollo debido a que la población utiliza la combustión incompleta del carbón y de la biomasa como energía doméstica.

1-COMPONENTES DEL AIRE CONTAMINADO

Los contaminantes del aire se pueden clasificar en dos categorías según su origen: primarios y secundarios. Los primarios son emitidos directamente a la atmósfera. Los más importantes son el material particulado (MP) y algunos

gases como el dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO) y óxido de nitrógeno (NO_2). Bajo condiciones apropiadas los contaminantes primarios sufren reacciones químicas en la atmósfera y generan los contaminantes secundarios, por ejemplo el ozono.

No todas las sustancias que ingresan al aire permanecen en él de manera indefinida. Las reacciones químicas, las precipitaciones, la sedimentación gravitacional y la absorción por la vegetación son procesos naturales mediante los cuales se eliminan los gases y el MP. Sin embargo la eficacia de estos procesos es menor que la velocidad de emisión de los contaminantes.

Con respecto a los niveles máximos de contaminantes ambientales se toman como referencia aquellos valores recopilados por la *Environmental Protection Agency* (EPA, Agencia de Protección Ambiental). Este organismo oficial, creado en Estados Unidos en 1970, tiene como misión proteger la salud humana y salvaguardar el medio ambiente mediante el control del cumplimiento de las leyes regulatorias ambientales. EPA ha establecido estándares de calidad de aire de referencia para los seis contaminantes más comunes (*criteria pollutants*): monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y de azufre, ozono, plomo y MP^3 (Tabla I).

MONÓXIDO DE CARBONO: proviene de combustiones incompletas de compuestos orgánicos de origen industrial, urbano y doméstico.

OXIDOS DE NITRÓGENO: es un término genérico que describe un grupo de gases altamente reactivos que contienen nitrógeno y oxígeno en cantidades variables. Las fuentes primarias son la combustión en vehículos, en las centrales termoeléctricas y en las industrias. Es el principal constituyente del *smog* y de la lluvia ácida.

OXIDOS DE AZUFRE: se forman como consecuencia de la combustión de materiales que contienen azufre (carbón, petróleo). Son producidos

principalmente durante la combustión del carbón en centrales eléctricas y durante ciertos procesos industriales como la producción de papel y la fundición de metales. También son componentes importantes de la lluvia ácida.

OZONO: este gas se genera naturalmente en las zonas altas de la atmósfera por la acción de la radiación ultravioleta del sol. No obstante cuando el ozono se genera en la superficie de la Tierra mediante la actividad industrial y urbana es un contaminante altamente tóxico que causa daños a la salud, al medio ambiente y a una gran variedad de materiales naturales y sintéticos.

PLOMO: en los últimos años se ha reducido parcialmente la contaminación atmosférica por plomo debido a su eliminación de los combustibles. No obstante se mantiene, aunque en niveles menores, debido a su presencia en pinturas, pilas, cerámicas etc.

MATERIAL PARTICULADO (MP): son partículas sólidas de distinto tamaño suspendidas en el aire, producidas por diversas fuentes.

ESTA CLASE DE CONTAMINANTE SERÁ OBJETO DE AMPLIA DESCRIPCIÓN A LO LARGO DE ESTE TRABAJO, ANALIZANDO SUS EFECTOS EN MODELOS BIOLÓGICOS Y SU POSIBLE INFLUENCIA EN LA SALUD HUMANA.

CONTAMINANTES DEL AIRES MÁS FRECUENTES	Monóxido de Carbono	
	Dióxido de Nitrógeno	
	Dióxido de Azufre	
	Ozono	
	Plomo	
MATERIAL PARTICULADO (PM)		<i>Ultrafine (UF-PM₁)</i>
		<i>Fine (PM_{2.5})</i>
		<i>Coarse (PM₁₀)</i>
		Partículas Totales en Suspensión (PST)

Tabla I: contaminantes más frecuentes del aire

2-MATERIAL PARTICULADO

En el pasado se consideraba que los efectos sobre la salud ocasionados por contaminantes del aire no eran de gravedad y que sólo ocurrían luego de episodios puntuales de contaminación. Además estos efectos se atribuían a contaminantes gaseosos. Pero estudios epidemiológicos ^{1,2} han indicado que estos efectos en la salud conducen a aumentos en la morbilidad y mortalidad humana, y que se trata de problemas acumulativos luego de exposiciones frecuentes. Por lo tanto, no es un problema menor y requiere especial estudio y atención. Además el MP presente en el aire cobró especial importancia debido a su creciente incremento y a la mejora de tecnologías que permiten su monitoreo con exactitud.

2.1-CARACTERÍSTICAS

El MP atmosférico se define como un conjunto de partículas sólidas en suspensión en la atmósfera.⁴ El término material particulado atmosférico es un concepto amplio que engloba tanto a las partículas en suspensión como a las partículas que sedimentan en el suelo.

El MP se puede clasificar según su origen, la constitución de su matriz y su tamaño:

A) POR SU ORIGEN:

- **MP natural:** proviene del medio ambiente, sin mediar la acción del hombre. Proviene de la erosión del suelo o de las erupciones volcánicas. En su mayoría, presentan un diámetro mayor a 10 µm.
- **MP antropogénico:** es el resultado de la actividad humana, principalmente de procesos industriales o combustiones abiertas. Estas partículas se caracterizan por poseer alta capacidad de adsorción, lo

cual favorece la adhesión a su superficie de metales pesados e hidrocarburos. Su tamaño es menor a 10 μm .

Las partículas emitidas por las industrias se controlan en el lugar de emisión por medio de instrumentos específicos como ciclones y muestreadores electrostáticos.^{5,6,7}

B) POR SU TAMAÑO:

El diámetro del MP en suspensión varía desde nanómetros (nm) hasta decenas de micrones (μm). Uno de los parámetros frecuentemente utilizados es el d_{ae} (diámetro aerodinámico), que representa el diámetro que tendría una esfera de densidad igual a 1g/cm^3 si tuviese la misma velocidad de sedimentación que la partícula en suspensión.⁸ El d_{ae} se emplea para MP respirable. También se expresan como distribuciones geométricas de tamaños cuando se trata de MP sedimentado.^{9,10}

En términos de calidad del aire se definen también cuatro parámetros fundamentales atendiendo al filtro empleado en los sistemas de captación: PST, PM_{10} , $PM_{2.5}$ y PM_1 (UF): el término PST se refiere a Partículas Totales en Suspensión (partículas menores a 20 μm de diámetro). PM_{10} , $PM_{2.5}$ y PM_1 (UF) definen conjuntos de partículas con un diámetro aerodinámico menor a 10 μm , a 2.5 μm y a 1 μm respectivamente.¹¹ En la Figura 1 observamos que, en general, a medida que disminuye el d_{ae} el porcentaje en masa de la fracción dentro de una muestra de MP es menor.

- **Partículas *ultrafine* (ultrafinas- PM_1 -UF):** son partículas menores a 0.1 μm (d_{ae}), principalmente de origen antropogénico. Se producen en grandes cantidades en las industrias de materiales para aplicaciones de alta tecnología (microelectrónica) y en centrales de generación de electricidad como consecuencia de procesos de combustión a altas

temperaturas. Dependiendo del material del cual provienen presentan niveles variables de metales de transición y de moléculas orgánicas adsorbidas.

- **Partículas *fine* (finas- $PM_{2.5}$):** son partículas menores a $2,5 \mu m$ (d_{ae}), en su mayoría de origen antropogénico. Se forman a partir de reacciones químicas a altas temperaturas durante la combustión de diferentes sustratos y están enriquecidas por combinaciones de sulfatos, nitratos, compuestos orgánicos y metales de transición (Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, Mn, y Fe).
- **Partículas *coarse* (gruesas- PM_{10}):** son partículas menores a $10 \mu m$ (d_{ae}) cuyo origen es tanto antropogénico como natural (abrasión de la superficie terrestre y la actividad volcánica). En estos últimos se generan a partir de procesos mecánicos y están enriquecidas principalmente por aluminosilicatos y óxidos.

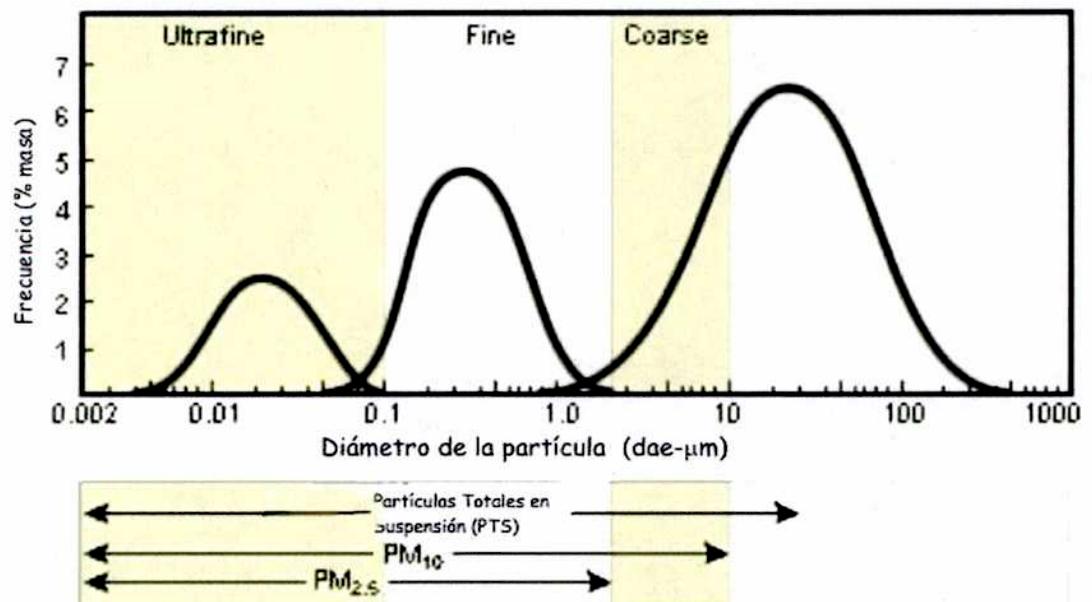


Figura 1: distribución del porcentaje en masa de partículas en función del diámetro aerodinámico.

ES NECESARIO ACLARAR QUE LA FRACCIÓN COARSE (PM₁₀) CONTIENE LAS FRACCIONES FINE (PM_{2.5}) Y ULTRAFINE (PM₁-UF). LA DISPONIBILIDAD DE ESTAS FRACCIONES, DISCRIMINADAS POR TAMAÑO, NOS PERMITE ENCARAR EL ESTUDIO DE SUS EFECTOS POR SEPARADO, INDEPENDIENTEMENTE DE LA COMPOSICION PORCENTUAL EN LA MUESTRA.

C) POR LAS CARACTERÍSTICAS DE SU MATRIZ

Las partículas pueden ser clasificadas según su matriz:

- **con alto contenido de carbono:** todas las partículas de origen antropogénico presentan una matriz altamente carbonosa. Se originan debido a la combustión incompleta que se lleva a cabo tanto a nivel urbano (combustión en vehículos) como industrial (entre otras la industria petroquímica).
- **con bajo contenido de carbono:** pueden ser tanto de origen natural (partículas de origen volcánico, erosión del suelo) como antropogénico. Estas últimas se originan debido a la combustión total de los combustibles fósiles en presencia de oxígeno en las centrales térmicas liberando cenizas que contienen baja proporción de carbono y alto contenido en trazas de metales. Estos combustibles fósiles son: derivados del petróleo, los cuales, luego de su combustión liberan *residual oil fly ash* (ROFA) o carbón, cuya combustión produce *coal fly ash* (CFA).

2.2-NIVELES DE MP ACEPTADOS MUNDIALMENTE.

Los efectos indeseables de la contaminación atmosférica se previenen manteniendo los niveles de los contaminantes dentro de valores aceptables definidos en las Normas de Calidad de Aire. Estas fueron establecidas en 1987 por EPA, organismo que definió los valores de Estándares

Internacionales de Calidad del Aire Ambiental (NAAQS-*Nacional Ambient Air Quality Standards*) para PM_{10} . Esto reduce las emisiones para mantener niveles aceptables para la salud humana. Se determinó que los niveles de PM_{10} no debían superar valores de $150 \mu g/m^3$ durante 24 horas y que el promedio anual diario no debía superar los $50 \mu g/m^3$.³

Sin embargo estudios epidemiológicos publicados en los primeros años de la década del 90 indicaron una consistente asociación entre pequeños aumentos en los niveles de $PM_{2.5}$ y aumentos en la mortalidad y morbilidad humanas. Por esta razón en 1997 se establecieron los límites para $PM_{2.5}$: $65 \mu g/m^3$ durante 24 horas y promedio anual de $15 \mu g/m^3$, mientras que la norma anual para PM_{10} se mantuvo sin cambios.¹¹

2.3- EFECTOS SOBRE LA SALUD

Numerosos estudios epidemiológicos^{12,13,14,15} han indicado una asociación entre exposiciones humanas a MP del aire e incrementos de la morbilidad y la mortalidad¹⁶, aún a bajos niveles de exposición. Los primeros registros sobre aumentos en la incidencia de problemas de salud luego de grandes episodios de emisión de MP fueron: Bélgica (1930)¹⁷, Londres (1952, 1962)¹⁸ y Nueva York (1953).¹⁹

Los efectos observados consisten principalmente en aumentos en la incidencia de enfermedades respiratorias crónicas, así como agravamiento de cuadros asmáticos. Se encontró una correlación entre las consultas para atención primaria debido a esta sintomatología en centros hospitalarios con los niveles de contaminación del aire correspondientes al día de la consulta²⁰ así como una asociación entre aumentos de los niveles de MP y riesgos de mortalidad post-neonatal.²¹

La exposición continua a MP exacerba patologías pulmonares pre-existentes²² como el Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (SDRA)^{23,24} y la

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) cuyas formas típicas se presentan como bronquitis crónica, enfisema²⁵ y asma.^{26, 27,28}

Otras poblaciones de riesgo susceptibles a daños en la salud generados por la exposición a MP son los niños^{29,30,31} ancianos³², fumadores³³, personas con exposición laboral continua^{34,35} y poblaciones carenciadas.³⁶

La contaminación del aire puede afectar la salud tanto a corto como a largo plazo. Los efectos inmediatos incluyen irritación de ojos, nariz y garganta e infecciones del tracto respiratorio superior, mientras que las afecciones crónicas incluyen patologías respiratorias y cardíacas, cáncer y daño a los riñones, hígado y sistema nervioso. La magnitud del daño depende del estado de salud de cada individuo, de la duración de la exposición y de la concentración y calidad del contaminante.

2.4-METODOLOGIAS EXPERIMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS GENERADOS POR MP

El aumento de las patologías humanas asociadas a la contaminación del aire generó la necesidad de estudiar sus efectos deletéreos y los posibles mecanismos de daño mediados por dicha contaminación, por medio de modelos experimentales en animales de laboratorio. Si bien estos estudios constituyen sólo una aproximación al problema, son muy útiles para identificar los componentes de MP que generan el daño y los eventos celulares y moleculares que conducen al mismo. Estos estudios conducen a la búsqueda e instrumentación de tratamientos efectivos que alivien los síntomas así como también a la implementación de estrategias de control para reducir los efectos adversos asociados con exposiciones a MP.

Las rutas clásicas de exposición a MP de los animales experimentales son la inhalación y la instilación intratraqueal (IT).

La **INHALACIÓN** consiste en introducir a los animales en una cámara experimental donde reciben MP a una tasa de concentración y velocidad constantes. A pesar de ser una vía de exposición fisiológica y de asegurar una distribución homogénea, esta técnica requiere un equipamiento costoso y grandes cantidades de MP. Además este tipo de exposiciones retiene cantidades significativas de partículas en la región nasal con la posterior ingestión de las mismas lo cual dificulta el análisis de los resultados.³⁷

La **INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL** es un método de bajo costo, que permite la incorporación instantánea de una cantidad conocida de MP, suspendida en un volumen pequeño de solución salina y dirigida directamente al pulmón e incluso a un lóbulo del pulmón. De esta forma se evita la deposición nasal o en la piel, como sucede con los modelos experimentales de inhalación. Es muy útil para estudiar los efectos en el tracto respiratorio inferior así como para la administración de compuestos altamente tóxicos o de materiales radiactivos.³⁷

Han surgido discrepancias entre los autores en cuanto a los resultados obtenidos con la técnica de IT y la de inhalación, especialmente en lo referido a la distribución homogénea de las partículas^{38,39}, la depuración de las mismas⁴⁰ y el patrón de daño.⁴¹ Sin embargo la IT es una técnica ampliamente empleada debido a que permite dirigir la muestra directamente al pulmón y a su fácil implementación.

2.5-CONTAMINACION DEL AIRE CON MP EN LA REPUBLICA ARGENTINA

A-SITUACIÓN GENERAL

Hay pocos estudios de base sobre la problemática de la contaminación atmosférica en nuestro país debido a la escasez de recursos y la falta de equipamiento tecnológico.

Las fuentes principales de contaminación del aire en la República Argentina son las fuentes móviles como los vehículos y las fuentes fijas como las industrias y las centrales termoeléctricas. La contaminación del aire en las grandes ciudades se debe principalmente a fuentes móviles mientras que, en zonas industriales como por ejemplo Ensenada y Bahía Blanca, el aporte de contaminantes provenientes de las fuentes fijas cobra mayor importancia debido a la presencia de destilerías e industrias petroquímicas.

La situación es preocupante debido a que los individuos que trabajan o circulan por áreas con altos niveles de contaminación reciben el impacto directo de los tóxicos emitidos. Las ausencias laborales y escolares generadas o agravadas debido a los altos niveles de contaminantes ambientales tienen un gran impacto económico y también constituyen un gasto importante en salud pública.

En la Ciudad de Buenos Aires las principales fuentes de contaminación atmosférica son el transporte vehicular y dos grandes centrales térmicas que utilizan principalmente gas natural. Según el Informe del Banco Mundial⁴², se considera que la contribución del sector industrial y energético a la contaminación del aire en esta ciudad no sería especialmente relevante, principalmente debido al uso del gas natural como combustible. Trabajos más recientes realizados para comprobar si el sector energético cumplía con los estándares de calidad del aire, indicaron que los valores de $PM_{2.5}$, de PM_{10} y

de azufre superaban los estándares de EPA.⁴³ Por otra parte se determinó que el 80 % de las emisiones de PM_{10} estaba constituido por $PM_{2.5}$.⁴⁴ Si bien esta situación se ve atenuada por un régimen de vientos favorables para la dispersión de estas partículas y por la ausencia de barreras naturales, estas ventajas no son suficientes para dispersar los contaminantes que se concentran como consecuencia de la creciente urbanización y del transporte automotor.

B-MARCO LEGAL

La Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, dependiente del Ministerio de Salud y Ambiente, es la autoridad competente en nuestro país para todos los aspectos relativos a emisión de gases contaminantes, ruidos y radiaciones parásitas. En el Artículo N°33 del Decreto N° 779/95 establece los límites máximos de emisión de contaminantes al medio ambiente y los procedimientos de ensayo establecidos, para los motores y vehículos automotores nuevos y usados.⁴⁵

Por otra parte la Resolución 708/96 de la Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente Humano estableció las *Normas de Medición de Concentración de Gases y Material Particulado emitidos por chimeneas*. La misma determina que es necesario establecer una metodología adecuada para la extracción de muestras y la medición de su concentración en chimeneas y que para ello resulta conveniente basarse en la legislación internacional para su aplicación a nivel nacional. En la misma se hace referencia a las metodologías y a los estándares de calidad de aire empleados por EPA.⁴⁶

C-EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE CONTAMINANTES DEL AIRE

Existen pocos estudios epidemiológicos en nuestro país pero algunos indican que hay una elevada correlación entre ciertas patologías como cáncer pulmonar frecuentes en trabajadores de ciertos tipos de industrias y exposiciones laborales a contaminantes del aire.⁴⁷

Trabajos realizados en nuestro país indicaron que los efectos biológicos producidos por la fracción orgánica de partículas finas de origen industrial y urbano consistían en eventos mutagénicos y citotóxicos que se correlacionaban con el contenido total de hidrocarburos poliaromáticos (PAH).^{48,49} Por otra parte trabajos realizados en la Provincia de Córdoba, empleando líquenes como bioindicadores, mostraron elevados valores de parámetros bioquímicos (contenido de clorofila, proteínas totales, malondialdehído) y acumulación de azufre en los líquenes ubicados en las zonas urbanas y en las zonas cercanas a las centrales de generación de energía eléctrica.^{50,51,52}

EN LA REPÚBLICA ARGENTINA NO HAY ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS PUBLICADOS QUE CORRELACIONEN LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR EMISIONES LOCALES DE MP CON PATOLOGÍAS EN LA POBLACIÓN. POR ESTA RAZON ES DE INTERES ABORDAR EL TEMA A NIVEL EXPERIMENTAL. PARA ELLO, EN ESTE TRABAJO EMPLEAMOS LA INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL COMO RUTA DE EXPOSICIÓN DEL MP EN RATONES.

3-MATERIAL PARTICULADO UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO

La actividad industrial, el transporte y la generación de energía basados en la utilización del carbón y el petróleo constituyen hoy la causa principal de la contaminación de origen antropogénico de la atmósfera.

3.1- MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DEL CARBÓN

La combustión del carbón libera MP que constituye un importante contaminante del aire. A pesar de que los productos de la combustión del carbón son contribuyentes muy importantes de la lluvia ácida y del efecto invernadero, muchos países, como Estados Unidos y China, lo emplean en grandes cantidades para la generación de energía eléctrica debido a que poseen enormes reservas carboníferas y tecnologías adecuadas para reducir la contaminación.

CARACTERÍSTICAS DEL CARBÓN

El carbón es una compleja combinación de materia orgánica e inorgánica formada a través de los siglos mediante el proceso de carbonización de sucesivas capas de vegetación. Durante este proceso se produce un incremento relativo en el contenido de carbono con respecto a elementos volátiles y humedad, acompañado por la pérdida de hidrógeno en forma de agua. Se clasifican según su carbonización progresiva de lignito a antracita (Figura 2).

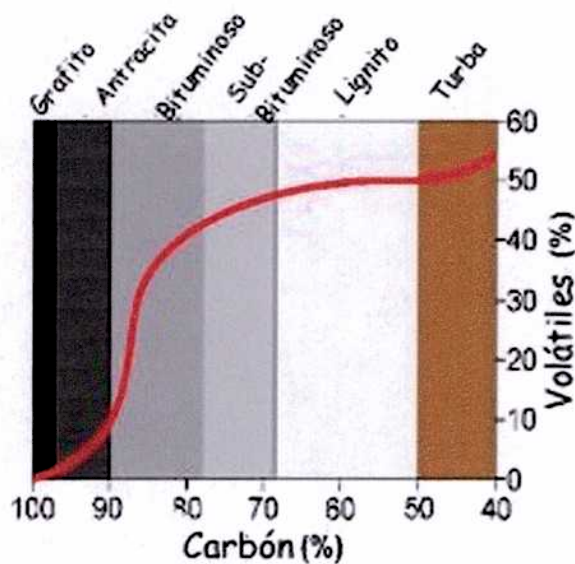


Figura 2: características de los diferentes tipos de carbón según su rango.

Las variedades bituminoso y sub-bituminoso son las más empleados para la generación de electricidad debido a su abundancia y alto contenido de carbono.

COAL FLY ASH (CFA)

Los principales contaminantes provenientes de la combustión de carbón bituminoso y sub-bituminoso son MP, óxidos de azufre y de nitrógeno. Este MP consiste fundamentalmente en CFA, constituido por partículas de tamaño menores a $10\ \mu\text{m}$ que contienen un alto contenido de trazas de metales (especialmente V, Pb, Cu, Zn, As, Cr, Se, Ni, Cd).

En las centrales eléctricas, donde se lleva a cabo la combustión completa de carbón, se produce la vaporización y condensación del CFA debido a que las temperaturas de combustión son extremadamente elevadas. Al vaporizarse, las cenizas se enriquecen en trazas de metales debido a que estos elementos inorgánicos son volátiles a las temperaturas empleadas para la combustión.⁵³ Posteriormente los gases se enfrían y los vapores inorgánicos se unen formando núcleos de aerosoles UF con un tamaño entre 0.01 y $0.03\ \mu\text{m}^2$. La fracción UF contenida en el CFA es de especial interés debido al impacto que

produce en la salud de la población pues, debido a su pequeño tamaño, escapa a los dispositivos de control.

Todo carbón contiene azufre. En el presente trabajo se empleará CFA proveniente de la combustión de carbón de Montana (oeste de USA) y W Kentucky (este de USA). Los primeros tienen menor contenido de azufre ($\sim 0.5\%$) comparados con los últimos ($> 2.0\%$). No obstante este 0.5% representa un contenido elevado de azufre. Durante la combustión del carbón, el 99% de la masa no vaporiza y contribuye a la fracción *coarse* mientras que el 1% restante se vaporiza, se nuclea y crece para formar partículas UF.⁵⁴ Sin embargo este 1% es responsable del 99% del número de partículas presentes en el CFA.

3.2-MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO

En este estudio se utilizó MP proveniente de episodios de emisiones de origen industrial (negro de humo y coque) y de origen urbano (MP recolectado en avenida de alto tránsito). Este MP proviene de la oxidación incompleta de combustibles.

A-COQUE DE PETRÓLEO

Se trata de un producto residual de la destilación del petróleo, con un alto contenido de carbono, que se emplea como combustible y para la fabricación de electrodos de grafito para la industria del aluminio.

Las coquerías de la Provincia de Buenos Aires reciben el coque crudo de las refinerías de petróleo. Éste es almacenado en grandes pilas al aire libre y por medio de cintas es transportado a hornos donde es calcinado a altas temperaturas. El proceso de calcinación libera al coque crudo de su contenido

de agua y de hidrocarburos no deseados para adquirir las características de pureza necesarias para ser utilizado como electrodo en la industria del aluminio. Estos ánodos de coque calcinado presentan bajos niveles de azufre y metales.

B-MP DE ORIGEN URBANO

Se trata del MP recolectado en diferentes puntos de centros urbanos. Incluye partículas provenientes principalmente de las emisiones de los vehículos y de actividades industriales. Debido al amplio empleo de diesel como combustible de los vehículos en las grandes ciudades, como la ciudad de Buenos Aires, esta clase de MP se encuentra enriquecida en los productos de la combustión del mismo: *Diesel Exhaust Particles* (DEP).⁵⁵ Consisten en matrices altamente carbonosas sobre las cuales se encuentran adsorbidos azufre y compuestos orgánicos.⁵⁶

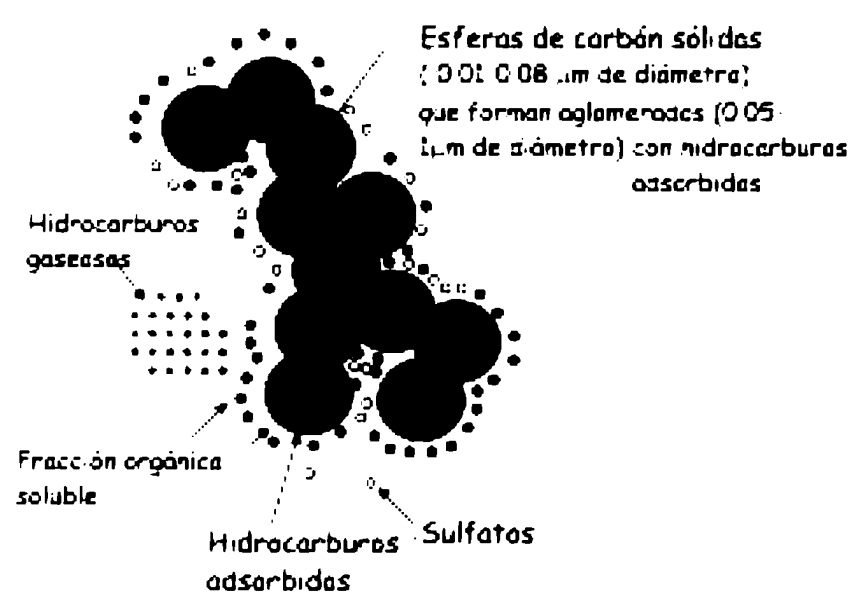


Figura 3: esquema de Diesel Exhaust Particles (DEP)

SECCIÓN II: Impacto biológico de los contaminantes del Aire

El tracto respiratorio superior es el primer sitio de impacto de los contaminantes del aire. El tamaño de la partícula determinará el lugar donde se depositará y su destino final, condicionando de esta manera las respuestas biológicas.

1-LOS PULMONES Y LAS VIAS AEREAS SUPERIORES

1.1-ESTRUCTURA BÁSICA PULMONAR

El tracto respiratorio puede dividirse en:

- superior: nariz, faringe, laringe y tráquea.
 - inferior: región pulmonar que comprende bronquios, bronquiolos y alvéolos.
- Esta última es la región del pulmón donde estudiaremos el efecto del MP.⁵⁷

1.2-ALVÉOLOS PULMONARES

Los alvéolos constituyen las regiones de intercambio gaseoso en el pulmón. La Figura 4 muestra la estructura microscópica de las paredes alveolares desde el lado capilar hacia el lumen alveolar:

- ENDOTELIO CAPILAR: tapiza la red de capilares sanguíneos.
- MEMBRANA BASAL separa a las células endoteliales del epitelio alveolar
- TEJIDO INTERSTICIAL: contiene finas fibras elásticas, pequeños haces de colágeno, algunos fibroblastos, células musculares lisas, mastocitos y escasos linfocitos y monocitos.
- EPITELIO ALVEOLAR: constituye la región donde se realiza el intercambio gaseoso. Consta de una capa continua formada por los siguientes tipos celulares:

a- *Células epiteliales de tipo I*: células aplanadas que recubren el 95% de la superficie alveolar.

b- *Células epiteliales de tipo II*: células redondeadas que producen el surfactante (sustancia tenso-activa) e intervienen en la reconstrucción del epitelio alveolar cuando las células de tipo I son destruidas.

c- *Macrófagos alveolares (MA)*: derivan de los monocitos sanguíneos y están ligeramente adheridos a las células epiteliales o se encuentran libres en el espacio alveolar. Son células fagocíticas responsables de la depuración pulmonar.⁵⁷

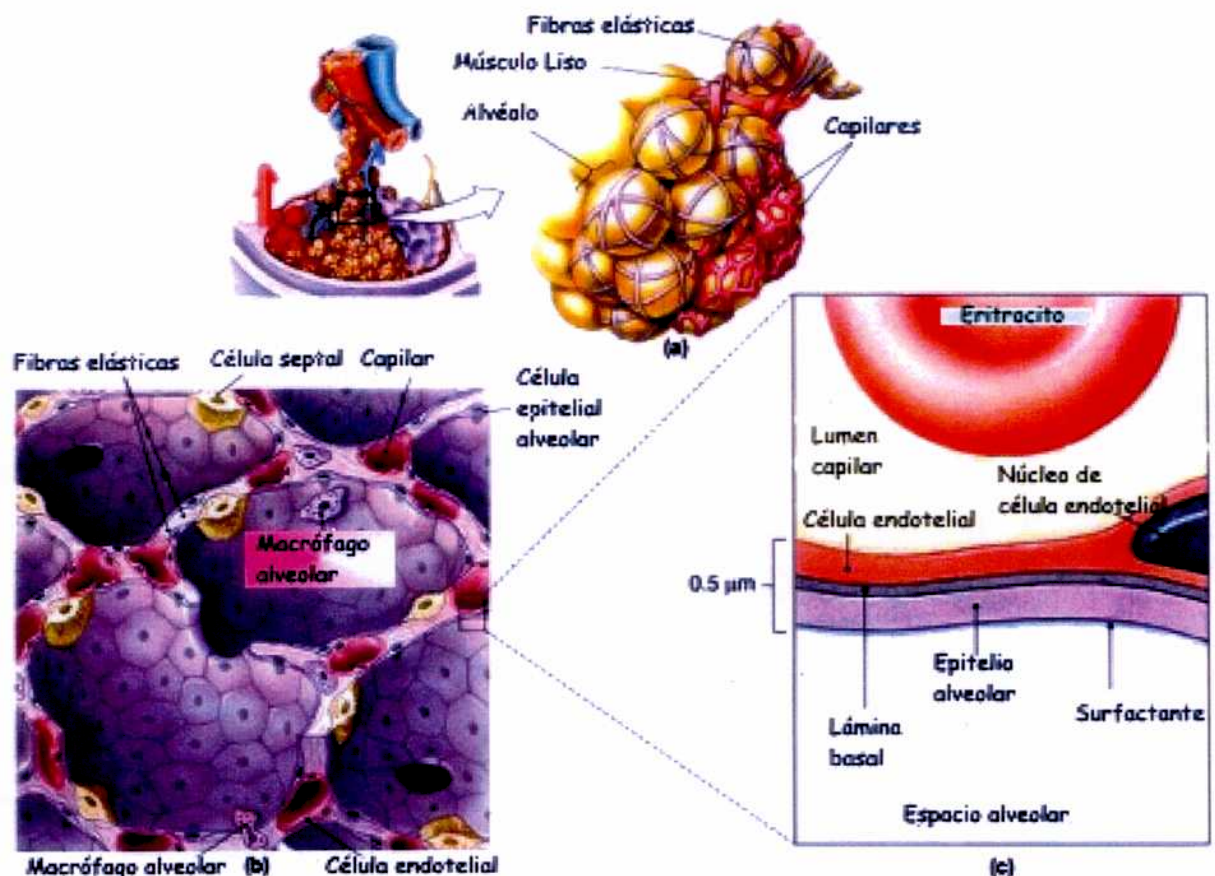


Figura 4: región alveolar pulmonar (a). Detalle de alvéolos pulmonares. (b). Región de intercambio gaseoso (c).

2- TRÁNSITO DEL MP EN EL APARATO RESPIRATORIO

Los efectos de la MP sobre la salud dependen en parte de su capacidad de alcanzar las defensas respiratorias y de depositarse en las estructuras del aparato respiratorio así como de la habilidad del organismo para eliminar o neutralizar las mismas.

El destino final del MP depende de su tamaño. Las partículas PM_{10} se depositan en la tráquea y en los bronquiolos. Ambos se encuentran tapizados por epitelio ciliado cubierto de mucus formando el *mucus escalador*. Su función es la de expulsar las partículas extrañas hacia la oro-faringe. De esta manera se liberan mecánicamente por expectoración o son conducidas al tracto gastrointestinal. Las partículas $PM_{2.5}$ y $PM_{10}MUF$ se depositan en la región alveolar y pueden permanecer allí durante períodos prolongados. Son fagocitadas por los MA y, además pueden pasar al sistema linfático y de esta manera alcanzar otras regiones del organismo.⁵⁸

2.1-DEPÓSITO

El tracto respiratorio superior es el primer sitio de impacto de los contaminantes. El depósito de partículas inhaladas en las diferentes regiones del sistema respiratorio depende de la dinámica de la respiración, del volumen pulmonar, de la salud del individuo y de las bifurcaciones en las vías respiratorias, las cuales producen constantes cambios en el flujo hidrodinámico. Una vez que las partículas se depositaron en el tracto respiratorio, algunas pueden ser transformadas y otras no, pero todas estarán sujetas a procesos de eliminación (*clearance*)⁵⁹ que dependerán de las propiedades físico-químicas de las partículas, del sitio inicial de deposición y de su tránsito a otras regiones del organismo mediante la circulación linfática. La retención de partículas esta determinada por la

relación dinámica entre los mecanismos de deposición y los de remoción de las mismas.

El tamaño de la partícula determinará el lugar donde se depositará y su destino final, condicionando de esta manera las respuestas biológicas. Las PM_{10} se depositan en la tráquea y los bronquiolos mientras que las $PM_{2.5}$ y las partículas UF se depositan en la región alveolar. Dependiendo del flujo del aire, del tamaño de la partícula y de su localización en el sistema respiratorio, la deposición ocurre a través de los siguientes mecanismos.⁶⁰ (Tabla II)

A-IMPACTO INERCIAL

En la región bronquial, donde las vías aéreas presentan mayor diámetro, se producen flujos de aire de altas velocidades y, debido a la inercia, las partículas tienden a impactar sobre la superficie respiratoria. Este mecanismo opera principalmente para el caso de partículas mayores a $2\ \mu m$.

B-SEDIMENTACIÓN

En las regiones de los bronquiolos y alvéolos, donde el flujo del aire disminuye, las partículas se depositan por gravedad. Este mecanismo opera para partículas mayores a $0.1\ \mu m$.

C-DIFUSIÓN

En la región alveolar, donde el flujo aéreo es menor, las partículas se transportan desde una región de alta concentración de partículas a una región de menor concentración debido al movimiento browniano, el cual consiste en el movimiento al azar de las partículas debido al constante choque entre las mismas. Este mecanismo opera para partículas menores a $0.5\ \mu m$ de diámetro.

TAMAÑO	AREA DE DEPÓSITO	MECANISMO DE DEPÓSITO
2-30µm	traqueal y bronquial	impacto inercial
0.1µm -5µm	traqueal y bronquial	sedimentación
>0.5 µm	alveolar	difusión

Tabla II: mecanismos de depósito de MP en el pulmón

2.2-DEPURACIÓN

El pulmón normal no contiene bacterias y/o partículas extrañas. Una serie de potentes mecanismos de defensa eliminan o destruyen todas las partículas inhaladas de la siguiente manera⁵⁷:

A-DEPURACIÓN NASAL: las partículas son eliminadas normalmente a nivel de la nariz, mientras que las que se depositan más atrás son barridas por el epitelio ciliado cubierto de mucus hacia la nasofaringe donde son deglutidas.

B-DEPURACIÓN TRAQUEOBRONQUIAL: las partículas son eliminadas mediante el sistema mucociliar: el movimiento de batido rítmico de los cilios de las células epiteliales traqueales desplaza constantemente una película de mucus desde los pulmones hacia la oro-faringe. Las partículas adheridas a esta película son deglutidas o expectoradas (Figura 5).

C-DEPURACIÓN ALVEOLAR: las partículas y otros agentes externos que llegan hasta los alvéolos son fagocitadas por los macrófagos alveolares, los cuales las transportan a los bronquiolos dotados de cilios ⁶¹ y desde aquí hacia la oro-faringe donde son deglutidas. Si la carga de partículas es abundante y los MA están sobrecargados, el transporte por esta vía hasta la

superficie se ve disminuido.⁶² También puede ocurrir que los MA cargados de partículas se desplacen por los espacios intersticiales o se introduzcan en los capilares linfáticos.⁶³ De esta manera se realiza el transporte a otras regiones del organismo (Figura 5).

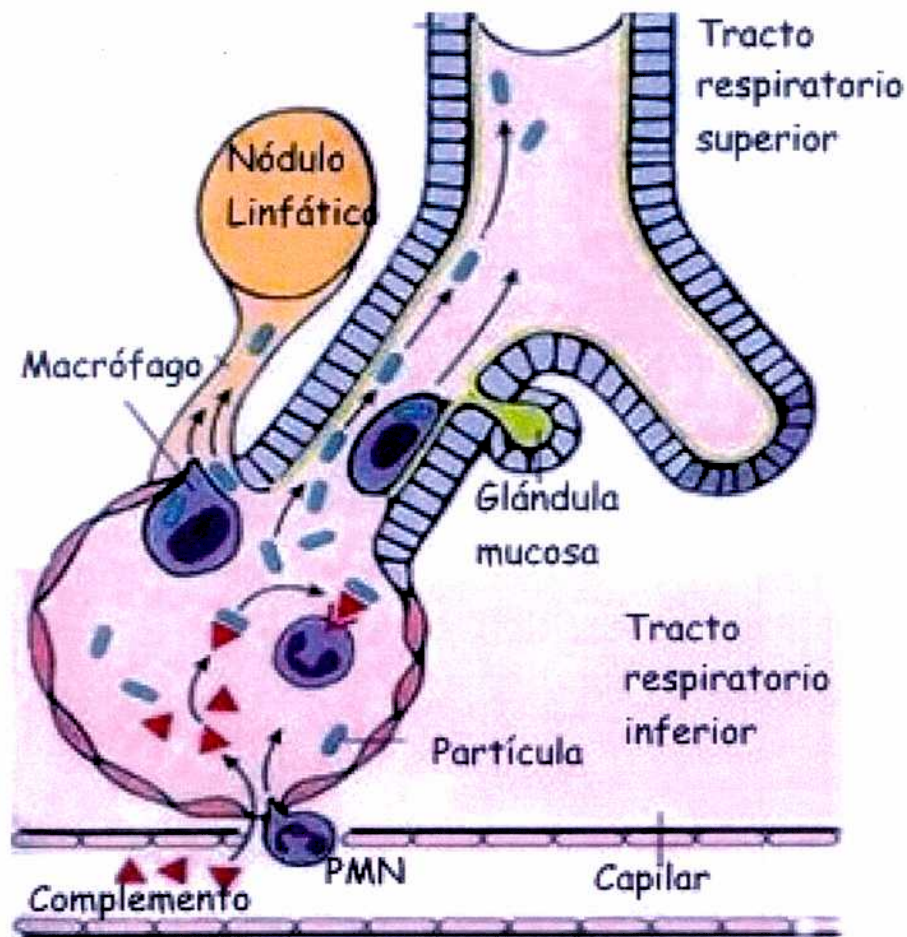


Figura 5: esquema de Depuración Traqueo- bronquial (liberación de mucus y ascenso por el sistema mucociliar) y alveolar (activación de macrófagos alveolares y extravasación de complemento y de PMN)

3-EFECTOS BIOLÓGICOS DEL MP

Los efectos iniciales mediados por el MP se originan a partir de la interacción directa de las partículas con estructuras pulmonares y de la interferencia con la depuración mucociliar o la fagocítica. La inhalación de MP y su depósito en los pulmones pueden alterar la estructura y el funcionamiento de partes vitales del organismo que pueden tener consecuencias sistémicas.

Cuando hay un excesiva sobrecarga pulmonar de MP, la tasa de acumulación de las partículas inhaladas es mayor que la tasa de depuración alveolar y esto genera un importante cuadro inflamatorio donde los MA y las células epiteliales se activan liberando mediadores inflamatorios que controlan y estimulan eventos genotóxicos^{64 65} y de fibrosis.^{66,67,68}

La información disponible no define con exactitud los mecanismos que relacionan la exposición al MP con los efectos respiratorios o sistémicos pero sí describe que la inflamación aguda constituye un evento inicial común independiente del tipo de MP: este proceso abarca una amplia gama de eventos celulares y mediadores químicos y será explicado con mayor detalle en la Sección II.4. Brevemente, este proceso inflamatorio está caracterizado por el flujo de neutrófilos (PMN) y macrófagos al pulmón y por la pérdida de la integridad de la barrera epitelial. Estas células liberan mediadores como citoquinas⁶⁹ y factores de crecimiento⁷⁰ con el objetivo de destruir el material inhalado e iniciar la reparación del daño. Pero estos mediadores son inespecíficos y, si son liberados en grandes cantidades, pueden aumentar el daño a los tejidos.⁷¹

Una de las hipótesis con mayor peso atribuye los efectos inflamatorios del MP a su capacidad de generar ROS (Reactive Oxygen Species)⁷² y RNS (Reactive Nitrogen Species).^{73,74} Esto puede ocurrir tanto a nivel celular como extracelular^{75,76 77} por reacciones de oxidación. En ambos casos esto conduce a un aumento de la respuesta inflamatoria y a un daño a las células

circundantes, especialmente al epitelio alveolar.^{78, 79} Un buen ejemplo de la participación de las ROS en el proceso inflamatorio es la regulación del gen de IL-8, cuya expresión se encuentra regulada por factores de transcripción sensibles a los cambios redox, como el factor nuclear κ B (NF κ B) y el factor activador de proteína-1 (AP-1).^{80, 81} Otros estudios han demostrado la inducción de la expresión de TNF- α en respuesta a estrés oxidativo.⁸² Por otro lado es interesante destacar que la generación de daño pulmonar mediado por la generación de Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)^{83,84,85} ha sido descrita en animales experimentales luego de la exposición a compuestos de origen mineral como sílice y asbestos.

La liberación de citoquinas por macrófagos activados⁸⁶ y por células epiteliales pulmonares^{87,88,89} favorece la extravasación de PMN desde los capilares hacia el espacio alveolar. Este proceso se realiza mediante la acción quimio-atractante de la IL-8.

Otro grupo de investigación ha estado trabajando sobre la hipótesis de la *inflamación neurogénica*. Esta postula que las cargas presentes en la superficie del MP estimulan receptores sensibles a pH (*vanilloid receptors*), presentes en las células epiteliales pulmonares, lo cual estimula la expresión de citoquinas inflamatorias.⁹⁰

3.1-COMPONENTES DEL MP RESPONSABLES DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS.

Las patologías generadas por la exposición a MP pueden ser causadas por los distintos componentes del mismo. Aunque los efectos observados pueden deberse a la acción directa del MP sobre los tejidos respiratorios no hay que descartar los efectos mediados por compuestos secundarios provenientes de las modificaciones fisicoquímicas sufridas por las partículas a lo largo de su paso por las vías aéreas.

Los componentes responsables de estos efectos pueden estar relacionados con el tamaño de la partícula y su composición química.⁹¹

3.1.1-TAMAÑO

En general está aceptado que los efectos asociados a los problemas de salud provocados por la exposición a MP de origen antropogénico se encuentran más fuertemente asociados a las partículas finas que a las gruesas debido a que la masa de partículas finas inhaladas y su tiempo de permanencia en el tracto respiratorio son mayores.^{92,93}. Debido a que el avance tecnológico permite disponer de equipos para monitorear la emisión de las partículas UF y a reportes epidemiológicos que indican asociaciones entre estas partículas y efectos adversos en la salud de la población,^{94,95} en los últimos años se ha atribuido mayor relevancia a los efectos inducidos por la fracción UF en la morbilidad y mortalidad de la población.⁹⁶

La instilación de partículas UF de CB en animales experimentales generó un alto grado de inflamación pulmonar mediado por estrés oxidativo.⁹⁷ Dado que este material carece de metales, se descartó la influencia de los mismos en esta generación de ROS. Esta inflamación pulmonar se podría atribuir a la presencia de un mayor número de partículas y a una mayor área de contacto por unidad de masa en la fracción UF.^{98,99,100} Las partículas UF pueden penetrar rápidamente las células epiteliales debido a su pequeño tamaño y activar mecanismos inflamatorios.¹⁰¹ Además, pueden pasar a la circulación linfática y desde allí ejercer efectos sistémicos a nivel cardiovascular.¹⁰² Recientemente se ha observado la acumulación de UF en el sistema nervioso¹⁰³ luego de experiencias de instilación.

LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES CON MATERIAL UF SE HAN REALIZADO PRINCIPALMENTE CON CB¹⁰⁴ Y ÓXIDO DE TITANIO.^{105, 106} PERO A PESAR DEL CRECIENTE INTERÉS EN ESTE TEMA, SÓLO UNOS POCOS INFORMES HAN REPORTADO EFECTOS COMPARATIVOS DE PARTÍCULAS FRACCIONADAS POR TAMAÑO PROVENIENTES TANTO DE FUENTES DE COMBUSTIÓN A GRAN ESCALA COMO DE MP URBANO.^{107, 108} POR ESTA RAZÓN, MP FRACCIONADO SEGÚN SU TAMAÑO OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DEL CARBÓN SERÁ UTILIZADO EN NUESTROS ESTUDIOS EMPLEANDO MASAS IGUALES DE CADA FRACCIÓN. ESTO NOS PERMITIRÁ EVALUAR LOS EFECTOS DE CADA FRACCIÓN POR SEPARADO.

3.1.2-COMPOSICIÓN QUÍMICA

La presencia de metales de transición en el MP favorece reacciones de generación de ROS. La exposición de animales experimentales a partículas de ROFA, con altos niveles de metales solubles (Ni, Va) genera inflamación pulmonar¹⁰⁹ vía la producción de ROS.^{110, 111} Pero también la movilización de hierro insoluble, como el presente en las fibras de asbestos¹¹² y de CFA¹¹³, ha generado efectos similares.

La presencia de pequeñas cantidades de sulfatos asociados a MP produjo cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales en pulmones de animales experimentales.^{114, 115}

Por otra parte la presencia de moléculas orgánicas adsorbidas a matrices carbonosas también genera una amplia serie de respuestas pulmonares como activación de sistemas detoxificantes que amplifican la generación de ROS.^{116, 117}

3.2-EFECTOS BIOLÓGICOS DEL MP UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO

A-COAL FLY ASH (CFA)

Dado que la composición físico-química del CFA depende del tipo de carbón y de las condiciones de combustión es importante tener en cuenta estos factores cuando se comparan los resultados publicados por diferentes grupos de trabajo.

Los efectos tóxicos en las vías respiratorias en ratas instiladas con CFA.^{118,119,120} están caracterizados por reacciones inflamatorias que conducen a importantes alteraciones pulmonares. Sin embargo en estos trabajos no se han utilizado CFA fraccionado por tamaño. También se ha descrito la inducción de enzimas hepáticas y pulmonares como citocromo P450 y glutatión transferasa¹²¹ así como la presencia de metales¹²² en pulmones de animales tratados con CFA. Estos efectos podrían estar mediados principalmente por los metales presentes en el CFA debido a que altos niveles de metales solubles presentes en CFA aumentaban la susceptibilidad a infecciones y que el grado de susceptibilidad a las mismas estaba correlacionado con la citotoxicidad de MA *in vitro*.¹²³

ES IMPORTANTE EVALUAR LOS EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE CFA SEGÚN SU TAMAÑO. DEBIDO A QUE LOS DISPOSITIVOS DE CONTROL NO LOGRAN DETENER COMPLETAMENTE LA EMISIÓN DE LA FRACCIÓN UF. ÉSTA, AÚN EN MUY BAJAS CONCENTRACIONES, RESULTA TÓXICA DEBIDO AL ALTO CONTENIDO DE METALES PRESENTES Y AL ELEVADO NUMERO DE PARTÍCULAS QUE GENERALMENTE CONSTITUYEN ESTA FRACCIÓN.

B-COQUE DE PETROLEO

Numerosos estudios epidemiológicos en humanos han indicado que el trabajo en los hornos de coque puede producir un aumento significativo en el riesgo de cáncer de pulmón^{124,125,126,127}, disminución en la función pulmonar¹²⁸ y en ciertas funciones inmunológicas.¹²⁹ Además también se informaron niveles séricos de IgG e IgA disminuidos¹³⁰ y valores séricos de IgE y de TNF- α superiores a los normales.⁹⁰ También se ha demostrado que las partículas de coque son mutagénicas en células de mamíferos^{131, 132}, hecho asociado al alto contenido de PAH presentes en las mismas.

SIN EMBARGO NO SÓLO LOS TRABAJADORES DE LA INDUSTRIA DEL COQUE ESTÁN EXPUESTOS A ESTA CLASE DE MP. LA EXPOSICIÓN CONTINUA A NIVELES BAJOS DE CONTAMINACIÓN DURANTE EMISIONES NO CONTROLADAS PUEDE PRODUCIR EFECTOS DELETÉREOS A CORTO Y LARGO PLAZO EN LAS POBLACIONES VECINAS A LOS SITIOS DE FABRICACIÓN DEL COQUE, CON EL CONSIGUIENTE PERJUICIO PARA LA SALUD HUMANA CON CONSECUENCIAS IMPREVISIBLES EN EL PRESENTE Y EN EL FUTURO.

C-MP URBANA

El MP se encuentra formado por una mezcla de partículas provenientes de la actividad humana de origen: industrial, del suelo, de centrales termoeléctricas, etc. En ciudades como la ciudad de Buenos Aires, donde el diesel es el combustible empleado mayoritariamente por los vehículos, este MP presenta un alto contenido de Diesel Exhaust Particles (DEP).

Las DEP generan inflamación pulmonar¹³³ así como el agravamiento de cuadros asmáticos y alérgicos.¹³⁴ La presencia de las mismas en la circulación podría explicar algunos efectos extra-pulmonares^{135,136} como por ejemplo un mayor riesgo de infarto de miocardio.¹³⁷ Las DEP y sus extractos orgánicos generan tanto inflamación pulmonar^{138, 139}, como efectos pro-trombóticos¹⁴⁰ en animales experimentales mediante la generación de ROS^{141,142,143} y de RNS.¹⁴⁴

LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DEL MP DE ORIGEN URBANO VARÍAN AMPLIAMENTE SEGÚN LAS DIFERENTES ACTIVIDADES URBANAS Y LAS CONDICIONES ATMOSFÉRICAS DEL LUGAR. POR ESTA RAZÓN, DEBIDO A LA PRESENCIA DE ELEVADOS NIVELES DE MP EN LA CIUDAD DE BUENOS AIRES, SE CONSIDERÓ NECESARIA LA EVALUACIÓN DE SUS EFECTOS EN MODELOS BIOLÓGICOS.

De lo analizado en los puntos anteriores se desprende que la inflamación aguda a nivel pulmonar es un evento inicial y que se sostiene como consecuencia de exposiciones frecuentes a MP contaminante del aire. Por lo tanto al encarar el estudio de los efectos biológicos de MP de origen antropogénico generados por la combustión del carbón y de derivados del petróleo, con especial énfasis en coque y CFA, es necesario enfatizar el análisis de indicadores de inflamación pulmonar aguda.

4-INFLAMACIÓN AGUDA

La inflamación es la reacción del organismo frente a la invasión de agentes infecciosos, agentes físicos y estimulación antigénica.

La inflamación aguda es la respuesta inmediata de carácter protector que se produce frente al agente lesivo. Tiene una evolución breve y dura unos pocos días. Las características principales de la inflamación aguda son:

- modificaciones en el calibre de los vasos que da lugar al aumento en el flujo de sangre.
- alteraciones en la estructura de la micro-vasculatura que favorecen la extravasación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos.
- emigración de los leucocitos desde la circulación hasta el foco de la lesión, en el que se acumulan. Los leucocitos también prolongan la inflamación e inducen lesiones en los tejidos al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos del oxígeno.

Los eventos celulares propios del proceso inflamatorio son:

-ADHESIÓN Y MIGRACIÓN: consiste en la fijación al endotelio vascular de las células circulantes y su desplazamiento entre las células endoteliales. Estos dos procesos están determinados por la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de los leucocitos y en las células endoteliales.

-QUIMIOTAXIS: consiste en la locomoción celular orientada según un gradiente químico. Después de atravesar el endotelio los leucocitos migran en los tejidos hasta alcanzar la zona de la lesión bajo estímulos quimiotácticos. Estos pueden ser exógenos: péptidos formilados y lipopolisacáridos (LPS) ó endógenos: componentes del sistema de complemento (C5a), leucotrieno B4, y citoquinas (por ejemplo la quemoquina IL-8 -humanos/MIP-2-roedores).

-ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA: consiste en la producción de metabolitos del ácido araquidónico (AA), degranulación y secreción de enzimas lisosomales y activación del estallido respiratorio.

-FAGOCITOSIS: consiste en la ingestión de la partícula o microorganismo mediante la activación de un sistema contráctil de actina y miosina que extiende pseudópodos alrededor de la partícula. Se produce una invaginación

de la membrana con la posterior formación de un fagosoma que contiene la partícula ingerida.

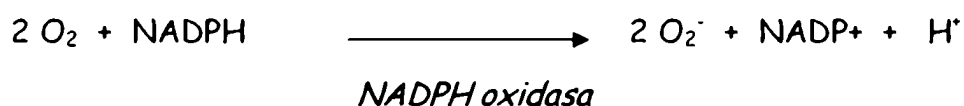
-DEGRADACIÓN: la exposición a productos microbianos, a citoquinas y también a partículas contaminantes del aire activa los mecanismos para la degradación del material fagocitado. Estos pueden ser dependientes o independientes de oxígeno.

A-MECANISMOS OXÍGENO-DEPENDIENTES

La fagocitosis y diversos agonistas inflamatorios estimulan un fuerte incremento en el consumo de oxígeno, en la glucogenólisis, en el aumento de la oxidación de la glucosa mediante la generación de hexosa monofosfato¹⁴⁵ y en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. A este proceso se lo denomina *estallido respiratorio*.¹⁴⁶ Este proceso comprende la formación de ROS y RNS:

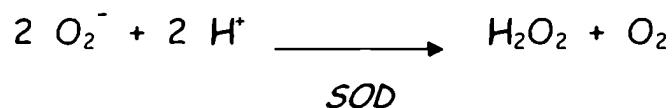
- A.1-Generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS):

Las alteraciones en el metabolismo del O₂ conducen a la activación de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa)¹⁴⁷ presente en la membrana de las células fagocíticas. La NADPH oxidasa cataliza la reducción del O₂ en O₂⁻ a expensas de NADPH:

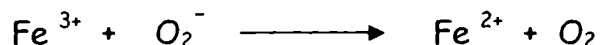


El O₂⁻ es capaz de reaccionar con una amplia variedad de sustratos biológicos, pero por sí solo no cumple un rol relevante en las respuestas citotóxicas desarrolladas. Esto se debe a su escaso poder oxidante y a la velocidad y eficiencia con que dos moléculas de O₂⁻ se combinan para formar

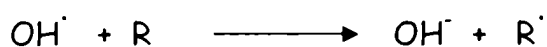
peróxido de hidrógeno. Esta reacción puede ocurrir simultáneamente o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD)



El radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) se origina mediante la interacción de O_2 y H_2O_2 a través de la reacción de Haber-Weiss, catalizada por Fe^{3+} .¹⁴⁸



El radical hidroxilo es un poderoso oxidante que sustrae electrones de una gran variedad de compuestos y genera la formación de nuevos radicales capaces de oxidar otras sustancias:



La actividad oxidante de las ROS contribuye a la destrucción y digestión de los microorganismos fagocitados.

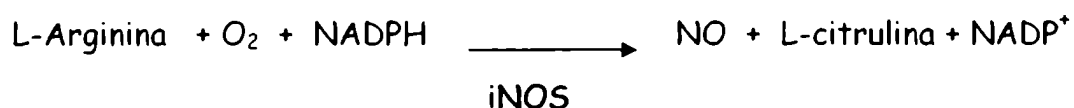
Las ROS pueden ser liberadas por los leucocitos al espacio extracelular incrementando la expresión de las citoquinas, quemoquinas y de las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial amplificando la cascada que da lugar a la respuesta inflamatoria.

Cuando estos mediadores químicos se liberan a altas concentraciones pueden producir lesiones en el huésped como lesión de células endoteliales (incremento de la permeabilidad capilar), inactivación de anti-proteasas (con la consecuente destrucción de la matriz extracelular) y lesiones de otros

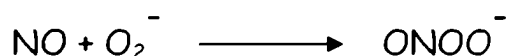
tipos celulares (células tumorales, eritrocitos etc). Por esta razón en todos los tejidos se encuentran moléculas antioxidantes protectoras frente a las ROS. Entre estos antioxidantes se encuentran las enzimas SOD, catalasa y glutatión peroxidasa.

- A.2-Generación de Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)

La iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) es una enzima presente en fagocitos, cuya activación y expresión es inducida por citoquinas inflamatorias.¹⁴⁹ Esta enzima combina el O_2 con la arginina para dar óxido nítrico (NO) el cual es tóxico para las bacterias y células tumorales. La iNOS es inducida a nivel transcripcional cuando los macrófagos son activados por las citoquinas (TNF- α , IFN- γ).



El NO tiene una vida media muy corta en los tejidos porque reacciona con el O_2 y el O_2^- . El producto de la reacción con este último es el peroxinitrito. Este último oxida y nitrosila macromoléculas, amplificando el efecto bactericida.



Si bien la actividad oxidante de las ROS y las RNS contribuyen a la destrucción y digestión de los microorganismos fagocitados y son fundamentales como línea de defensa frente a agentes patógenos, un aumento en el número o función de los leucocitos producido por la exposición a los contaminantes presentes en el aire está también asociado al desarrollo de daño o enfermedad pulmonar debido a la generación excesiva de estas moléculas altamente reactivas.⁷¹

Por otra parte los macrófagos alveolares están enriquecidos en enzimas que metabolizan xenobióticos. Este proceso contribuyen a la generación de ROS.^{150, 151} Los xenobióticos (compuestos ajenos al cuerpo) de mayor importancia son los fármacos, carcinógenos químicos y compuestos presentes en el ambiente como, por ejemplo, hidrocarburos poli-aromáticos (PAH). Gran parte de estos compuestos se metaboliza en el hígado, pero en el pulmón también se encuentran enzimas detoxificantes en niveles considerables. Ejemplos de estas enzimas incluyen citocromo P4501A1 (metaboliza PAH)^{152,153} y glutathione -S transferasa (GST).¹⁵⁴

B-MECANISMOS OXIGENO-INDEPENDIENTES

La destrucción del material fagocitado también puede ocurrir por acción de sustancias contenidas en los gránulos de los leucocitos. El fagosoma puede fusionarse con gránulos que poseen componentes destructivos. Los PMN presentan gránulos *primarios o azurófilos* (que contienen enzimas microbicidas como lisozima, enzimas neutras como elastasa e hidrolasas ácidas como β -N-acetil-glucosaminidasa (NAG) y *gránulos secundarios o específicos* (que contienen enzimas como fosfatasa alcalina y lisozima y proteínas de transporte como lactoferrina, entre otras).⁵⁷ Los MA presentan altos niveles de enzimas hidrolíticas como fosfatasa alcalina, NAG, lisozima y enzima convertidora de angiotensina (ACE).

MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

Los principales tipos celulares que secretan o sintetizan mediadores químicos son: las plaquetas, los PMN, los monocitos/macrófagos y los mastocitos, aunque las células mesenquimales (endotelio, músculo liso, fibroblasto) y la mayor parte de los epitelios también pueden ser inducidos para elaborar algunos de los mediadores. Entre estos podemos destacar:

A-CITOQUINAS Y QUEMOQUINAS

Las citoquinas son proteínas producidas durante las respuestas inmunitaria e inflamatoria por muchos tipos celulares y regulan la función de otros tipos celulares.

Las interleuquinas representan una amplia gama de citoquinas elaboradas por células principalmente por células hematopoyéticas y cuya principal acción se realiza sobre los leucocitos.

La IL-1 y el TNF- α son mediadores de la inflamación. Estas citoquinas comparten muchas propiedades biológicas y son producidas por macrófagos activados. Su secreción es estimulada por endotoxinas, inmunocomplejos, toxinas, lesiones físicas y diversos procesos inflamatorios.^{155,156} Inducen la expresión de moléculas de adhesión endotelial y de mediadores químicos, como quemoquinas, factores de crecimiento, eicosanoides y NO.

Las quemoquinas son citoquinas que tienen la capacidad de estimular el movimiento leucocitario (quimiocinesis) y el movimiento dirigido (quimiotaxis). Entre ellas se encuentra la IL-8, presente en humanos (MIP-2-roedores).¹⁵⁷

B-OXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico fue descrito inicialmente como un factor liberado por las células endoteliales cuya acción principal es la vasodilatación a través de la relajación del músculo liso de la pared vascular.¹⁵⁸ Es un gas soluble, sintetizado principalmente por células endoteliales, pero también por muy variados tipos celulares, en particular, macrófagos y neuronas. El NO es un potente vasodilatador, reduce la agregación y adhesión plaquetaria y actúa como regulador del reclutamiento de leucocitos. También actúa en la respuesta del huésped frente a la infección, con efectos citotóxicos sobre bacterias, helmintos, protozoos y células tumorales, con el riesgo de una reacción inflamatoria potencial sobre células y tejidos del huésped.

DEBIDO AL CRECIENTE AUMENTO DE LAS EMISIONES DE MATERIAL PARTICULADO DE ORIGEN ANTROPOGÉNICO Y LA CONSIGUIENTE CONTAMINACIÓN DEL AIRE, ES DE INTERÉS EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS INMEDIATOS PRODUCIDOS EN EL APARATO RESPIRATORIO DEBIDO A QUE ESTE CONSTITUYE LA VÍA DE ENTRADA DE LOS CONTAMINANTES AL ORGANISMO. EN NUESTRO PAÍS ES ESCASA LA INFORMACIÓN SOBRE ESTA PROBLEMÁTICA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Se ha demostrado que los altos niveles de partículas contaminantes del aire, depositados en las vías respiratorias, producen numerosas patologías pulmonares y cardiovasculares en el hombre, con el consiguiente perjuicio a nivel económico y de salud pública.

Este trabajo consiste en el estudio de la acción de MP sobre las vías aéreas de animales experimentales *in vivo* y sobre células inflamatorias *in vitro* y su relación con las características fisicoquímicas de las mismas. A este fin se utilizarán partículas contaminantes antropogénicas originadas en fuentes emisoras de MP localizadas en distintos lugares geográficos. Estas partículas provienen de procesos de combustión de carbón y de derivados del petróleo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluación de los efectos de MP proveniente de la combustión de derivados del petróleo y del carbón:

A) MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DEL CARBÓN: COAL FLY ASH (CFA)

La combustión del carbón para la generación de corriente eléctrica genera cantidades significativas de CFA cuya emisión al aire se controla mediante adecuados dispositivos de control. Si bien las centrales generadoras utilizan tecnologías efectivas para la reducción de MP, los dispositivos utilizados presentan una baja eficiencia para la retención de partículas ultrafinas. El análisis de los efectos biológicos de sus fracciones contribuirá a determinar sus propiedades toxicológicas. Por esta razón en este trabajo se evaluarán

los efectos biológicos de las fracciones *coarse*, *fine* y *ultrafine* y su relación con las características físico-químicas de las mismas. Se realizará un estudio comparativo entre CFA proveniente de carbón bituminoso y sub-bituminoso con el fin de establecer el efecto diferencial de carbón de diferente origen geológico.

B) MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO: COQUE Y MP DE ORIGEN URBANO

La actividad industrial, basada en la combustión de productos derivados del petróleo, es otra fuente importante de MP. En este trabajo se estudiarán los efectos producidos por partículas de coque provenientes de una planta productora que en los últimos años ha generado frecuentes episodios de emisión accidental del producto, con la consiguiente exposición al mismo de la población aledaña al establecimiento.

El MP de origen urbano (emisiones producidas por la combustión de vehículos, emisiones domésticas etc.) también es otra fuente importante de contaminación del aire. Por lo tanto su acción como agente nocivo para la salud de la población será evaluada experimentalmente en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

SECCIÓN I: Material Particulado

1-ORIGEN Y MUESTREO DEL MP

1.1-MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DEL CARBÓN.

COAL FLY ASH

La obtención de cenizas producidas por la combustión del carbón (CFA) se realizó en el National Risk Management Research Laboratory, (NRMRL, US EPA). Se utilizaron dos tipos de carbón de diferente origen geológico y localización geográfica: Montana (sub-bituminoso) y W. Kentucky (bituminoso) los cuales presentan un contenido de azufre de 0,83 y 3,11% respectivamente y de cenizas de 11,72 y 8,07% respectivamente.¹⁵⁹ Es de especial interés para el NRMRL caracterizar las partículas de CFA debido al frecuente empleo del carbón como combustible para generación de electricidad en USA. Si bien este combustible es más contaminante que los derivados del petróleo, su abundante existencia explica su amplia utilización para estos fines.

La producción de estas cenizas se llevó a cabo experimentalmente, a escala de laboratorio, utilizando un horno de combustión. Las condiciones se mantuvieron similares a las encontradas en las unidades de combustión a gran escala.^{160,161}

Luego de la combustión de los dos tipos de carbón se recolectaron tres fracciones de cada uno que difieren en su diámetro aerodinámico: *Coarse*, *Fine* y *Ultrafine*.

Grandes cantidades de partículas F y C se recolectaron por medio de un ciclón. El MP resultante se recolectó sobre filtros de Teflón de 64,8 cm de diámetro. A continuación se transfirieron a un recipiente para muestras y se conservaron en un desecador a temperatura ambiente. Las partículas UF utilizando un impactador de baja presión.¹⁶² Se tomaron muestras de los

cuatro niveles inferiores del impactador, los cuales concentran partículas con un diámetro menor a 0,2 μm .

LOS PROCESOS DE GENERACIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN BASE A LA COMBUSTIÓN DEL CARBÓN PUEDEN REPRODUCIRSE A PEQUEÑA ESCALA Y, DE ESTA MANERA, FACILITAR LA OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES DE DISTINTO DIÁMETRO AERODINÁMICO: COARSE (C), FINE (F) Y ULTRAFINE (UF). ESTO PERMITIRÁ EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE CADA UNA DE LAS TRES FRACCIONES.

1.2-MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO

COQUE DE PETROLEO

La Secretaría de Política Ambiental de la Provincia de Buenos Aires (SPABA) recibió reiteradas denuncias en relación al depósito de partículas contaminantes en diversas zonas cercanas al puerto de la ciudad de La Plata. Este organismo seleccionó una planta industrial productora de coque, cercana a los domicilios afectados, como probable responsable de la emisión de las partículas. Esta industria utiliza coque crudo como materia prima que llega a la planta vía pluvial y es almacenado en grandes pilas. Por medio de cintas es transportado a hornos donde se calcina a muy altas temperaturas. De manera que existe la posibilidad de que las partículas provengan de las pilas o del sistema de transporte del coque crudo o de la chimenea de la planta donde se calcina el coque. La SPABA tomó muestras de las partículas depositadas en el suelo en varios puntos de la zona de influencia de la planta y las envió al Grupo Monitoreo Ambiental (GMA-CNEA) para realizar estudios que permitan identificar el origen de las mismas.

MP DE ORIGEN URBANO

La muestra representativa se tomó en el Centro Atómico Constituyentes (CNEA) que se encuentra ubicado en la Avenida General Paz, vía de alto tránsito vehicular. Estas partículas se recolectaron sobre filtros de teflón (Fisher Scientific, 37mm de diámetro, 2 μm de poro), utilizando un equipo muestreador de bajo volumen (Minivol Air Sampler-Airmetrics USA- Figura 1). El caudal de muestreo fue de 5L /min y se muestreó con el cabezal para $\text{PM}_{2.5}$. Esto asegura la obtención de una muestra representativa de MP urbana, con un $d_{ae} < 2,5$.

Los filtros sin muestra (blancos) se pesaron en una microbalanza y se controló que la humedad de los mismos se mantuviera por debajo del 20%. Estos fueron transportados al lugar de muestreo en cajas de Petri. Luego de recolectar el material los filtros se colocaron durante 24 hrs. en un desecador y se pesaron nuevamente bajo las condiciones previamente establecidas para los blancos. Posteriormente se agregaron 2 ml de PBS a la caja de Petri conteniendo el filtro con la muestra. A continuación se realizó un *scrapping* (raspado) de los mismos para obtener una suspensión de partículas la cual fue posteriormente esterilizada por autoclave. La masa de MP por filtro es la diferencia de peso entre el filtro con muestra y el mismo filtro pesado previamente al muestreo (blanco).

Figura 1: equipo muestreador de bajo volumen (Minivol Air Sampler-Airmetrics USA) utilizado para el muestreo de $\text{PM}_{2.5}$



LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE MP GENERADO POR LAS COMBUSTIONES INCOMPLETAS DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO PROVENIENTES DE ACTIVIDADES INDUSTRIALES Y URBANAS AFECTAN LA SALUD DE LA POBLACIÓN. ESTA PROBLEMÁTICA ESTÁ POCO DOCUMENTADA EN NUESTRO PAÍS.

2-CARACTERIZACIÓN DEL MP

A fin de determinar qué componentes del MP empleado en este estudio son los que ocasionan efectos biológicos, es importante el conocimiento tanto de las características físicas (tamaño, morfología y estructura cristalina) como químicas (composición elemental y componentes asociados a la superficie - azufre, trazas de metales, compuestos orgánicos-) del material particulado. Para esto se utilizaron diferentes técnicas según las características del material y la disponibilidad de equipamiento.

2.1-DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).

Esta técnica permite la identificación de la composición mineralógica de una muestra cristalina y está basada en las interferencias ópticas que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. El análisis de la muestra cristalina se realiza mediante un diagrama de difracción. Este es como una "huella digital" que la caracteriza y consiste en un conjunto de reflexiones de variada intensidad que dependen de la distribución de los planos que contienen los átomos del material. La intensidad de los picos depende de la homogeneidad de la muestra, del tamaño del grano y de la orientación preferencial de las partículas. Las muestras no recibieron ningún tratamiento previo. Fueron molidas en un mortero de ágata para lograr una

buena homogeneización, y 500 mg de muestra se colocaron en un porta-muestras de aluminio para cada medición.

En este estudio se empleó un equipo Philips X'Pert, con una unidad PW3710. Se empleó radiación de Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) y monocromador de grafito, ventanas de medio grado y pasos de $0,02^\circ$ en 2θ con tiempo de conteo de 2 segundos por paso en el rango de $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$. Los diagramas obtenidos fueron procesados por el conjunto de programas PC-APD de Philips, que permiten obtener la posición y la intensidad de los picos del diagrama. Para determinar las fases presentes en cada muestra se hace una identificación utilizando el programa de Philips PC-Identify, que permite reconocer los componentes presentes contrastando con una base de datos.¹⁶³

2.2-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

Esta técnica permite identificar muestras en base a sus características morfológicas de superficie. Las muestras estudiadas se prepararon esparciendo las mismas sobre cinta adhesiva doble faz adherida a un porta-muestra. En algunos casos, se las recubrió con una fina capa de metal conductor (Au) para mejorar la calidad de su observación. Se empleó un microscopio electrónico de barrido SEM Philips 515, (EDX 4100 y detector Si/Li y ventana de Be).

El estudio de la composición elemental se realizó mediante Espectrometría de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX).¹⁶⁴ La principal ventaja de la técnica de microanálisis es la posibilidad de analizar pequeños volúmenes de muestra sólida. Los resultados se presentan en forma de espectro de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) y posteriormente como porcentajes respecto del total de elementos analizados.

SECCIÓN II: Ensayos Biológicos

1-ANIMALES

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de 20 gramos (provenientes de Charles River -Raleigh, NC, USA) y ratas *Wistar* de 250-350g (provenientes del Bioterio del CAE, CNEA). Todos los animales recibieron alimentación *ad libitum*.

2-ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1-PREPARACIÓN DEL MP.

Las partículas de cada muestra fueron suspendidas en solución salina (NaCl 0,15 M) suplementada con gentamicina (10 mg/ml) a una concentración de 2mg/ml. Las partículas se sonicaron durante 20 minutos en un baño de agua ultrasónico (Ultrasonic Devices, Plainview) previo a la instilación o dilución.

2.2-INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL (IT)

Ratones CD1 fueron instilados por vía intratraqueal con solución salina ó suspensión de partículas (1.25 ó 5mg/kg). Los ratones fueron anestesiados con ketamina-xilazina (1,82mg/100g de ketamina y 0,27mg/100g de xilazina). Se utilizó una aguja intragástrica N°24 con una esfera de 1.25 mm de diámetro en el extremo. Esta aguja se conectó a una jeringa de 1 ml. Los ratones se colocaron en posición vertical, la aguja se introdujo en la cavidad oral y se instilaron 50 µl de solución salina o de la muestra a estudiar.

Los ratones instilados con solución salina se emplearon como controles negativos mientras que los ratones instilados con endotoxina bacteriana (10 µg LPS/ ratón) se emplearon como controles positivos para demostrar que los animales son capaces de responder a estímulos inflamatorios.

Los ratones utilizados para el estudio con DMTU recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de 0.5 ml de solución salina o de DMTU (500 mg/kg), 30 minutos previos a la instilación.

2.3-LAVADO BRONQUEOALVEOLAR (BAL) Y RECuento DIFERENCIAL DE CÉLULAS

Los animales fueron sacrificados 18 hrs luego de la IT. Para realizar el BAL se expuso la tráquea de la rata, se practicó un pequeño orificio entre los anillos cartilaginosos y se introdujo un trocar (No. 19) en el orificio y los pulmones se lavaron dos veces con PBS (35 ml/kg, total: 1,5-2 ml). La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1000 g durante 10 minutos. Posteriormente se obtuvieron dos fracciones: el sobrenadante (para la evaluación de parámetros bioquímicos y citoquinas) y el *pellet* celular (para la cuantificación de las diferentes poblaciones celulares).

El *pellet* obtenido fue resuspendido en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB inactivado (20 minutos a 60° C), 200 mM de glutamina y 60 U penicilina/estreptomicina y el sobrenadante (BALF-lavado bronco-alveolar fluido) se guardó a -20°C para posteriores determinaciones bioquímicas y de citoquinas.

A partir del *pellet* se realizó un recuento total de células por ratón utilizando una cámara de Neubauer y se midió la viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul tripán. La viabilidad resultó mayor al 95%. Mediante el empleo de una citocentrífuga se obtuvieron preparados celulares sobre portaobjetos, los cuales se tiñeron posteriormente con Diff Quick ó May-Grünwald-Giemsa. Esto permitió la identificación y cuantificación de macrófagos, PMN, eosinófilos y linfocitos en el BAL. Los recuentos se realizaron por duplicado en dos preparados diferentes, se contaron 200 células por ratón, y se calcularon porcentajes de cada tipo celular con

respecto al total. El peso de los animales empleados, así como también el volumen empleado para realizar los lavados y el volumen de BAL extraído por ratón eran homogéneos, por lo tanto los valores de número total de células expresados como células/BAL, son representativos.

3-ESTUDIOS *IN VITRO*

Mediante lavado bronco-alveolar (BAL) de ratas se obtuvieron poblaciones de MA en cantidad suficiente para los estudios *in vitro*. Brevemente, se expuso la tráquea de la rata, se practicó un pequeño orificio entre los anillos cartilaginosos y se introdujo una sonda intragástrica acoplada a una jeringa de 5 ml. Los pulmones se lavaron cuatro veces con 5 ml de PBS (1 ml/Kg, total 20 ml). Se recolectaron en el mismo tubo de centrífuga los BAL correspondientes a 5 ratas. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1000 g durante 10 minutos. El *pellet* obtenido fue resuspendido en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB inactivado (20 minutos a 60° C), 200 mM de glutamina y 60 U penicilina/estreptomicina. Posteriormente se realizó el recuento en una cámara de Neubauer y las células se resuspendieron a la densidad adecuada. También se evaluó su viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripán. En todos los casos se utilizaron poblaciones celulares con una viabilidad celular mayor al 95%. Los MA de rata se sembraron a la densidad adecuada según los ensayos: 10^6 células /cápsula (33 mm^2) ó 2×10^5 células/pocillo (en placas de 96 pocillos) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda, al 5% de CO_2 durante 2 hrs. A continuación se descartó el medio de cultivo para remover las células no adheridas, se agregó medio fresco y se mantuvieron en cultivo durante 24 hrs. Las suspensiones de MP se prepararon el mismo día de su utilización: las muestras de partículas fueron suspendidas en medio RPMI suplementado con

2% de SFB y se sonicaron durante 30 minutos. A continuación se agregaron a los cultivos.

Luego de 24 hrs de incubación, se recolectaron los sobrenadantes para determinaciones de parámetros bioquímicos, citoquinas y nitritos. Sobre las monocapas de células se realizaron los ensayos de viabilidad y de estrés oxidativo.

4-DETERMINACIONES

4.1-VIABILIDAD

CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRO (RN).

El Rojo Neutro es un colorante vital que es incorporado en forma activa únicamente por los lisosomas de células viables¹⁶⁵ y se utiliza frecuentemente para determinar la viabilidad celular.

Finalizado el tiempo de incubación con el MP, los cultivos de MA se lavaron con PBS y se cubrieron con RN (50 µg/ml). A fin de permitir la evaluación al microscopio óptico se modificó la técnica original¹⁶⁶: luego de 3 hrs de incubación a 37°C, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Se evaluó la viabilidad determinando el porcentaje de células que captaron el colorante. Esta modificación debió ser realizada dado que no es posible extraer el RN acumulado con metanol/ácido acético para su posterior lectura espectrofotométrica pues la presencia de MP intracelular enmascara el resultado final.

4.2.-PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

-**LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)**: se trata de un marcador de necrosis celular.¹⁶⁷ Se determinó mediante espectrofotometría utilizando un *kit* comercial.

-**ALBÚMINA**: un marcador de daño de los capilares pulmonares.¹⁶⁸ Se determinaron con un *kit* comercial realizando una curva estándar con albúmina bovina.

-**N ACETYL β D GLUCOSAMINIDASA (NAG)**: marcador de activación de macrófagos. Se determinó utilizando un *kit* comercial.¹⁶⁹

-**PROTEÍNAS TOTALES**: marcador de edema. Se determinó utilizando *Coomassie Blue* y se empleó una curva estándar de albúmina bovina.¹⁷⁰

4.3-CITOQUINAS

Los macrófagos alveolares se sembraron a una densidad de 10^6 células/cápsula en presencia de 250 $\mu\text{g/ml}$ de MP y se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Posteriormente se evaluó el contenido de citoquinas el medio celular así como también en el BALF de los animales tratados *in vivo*.

TNF- α

Se evaluó de dos maneras: la determinación de TNF- α en BALF de animales instilados con CFA se realizó utilizando un *kit* comercial, mientras que los niveles de TNF- α en BALF de animales instilados con MP carbonoso (coque y muestra urbana) y en los medios celulares de cultivos de macrófagos alveolares se determinaron en base a un ensayo biológico sobre la línea celular L-929.

A- UTILIZANDO UN KIT COMERCIAL:

Se colocó un anticuerpo TNF- α anti-ratón en placas de 96 pocillos durante 18 hrs a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS (0,05 % Tween 20) y posteriormente se incubó durante 2 hrs con un buffer de bloqueo a temperatura ambiente. La placa se lavó 4 veces con PBS (0.05% Tween 20). Luego se bloquearon los sitios inespecíficos con 300 μ l de PBS (5% de sacarosa y 1% albúmina bovina) durante dos hrs a temperatura ambiente. Se realizó la curva de referencia agregando 100 μ l de diluciones de estándares de TNF- α de ratón (0-1000 pg/ml). También se agregaron 100 μ l de los sobrenadantes de las muestras a analizar. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs. Posteriormente a cada pocillo se le agregó 50 μ l de un anticuerpo anti-ratón TNF- α biotinilado y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs. Luego la placa se lavó nuevamente y se agregaron en cada pocillo 100 μ l de peroxidasa-streptoavidina. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se lavó nuevamente y se agregaron 100 μ l de tetrametil benzidina (TMB) a cada pocillo. La placa permaneció en la oscuridad durante 30 minutos. Para desarrollar el color, se agregaron 100 μ l de ácido sulfúrico a cada pocillo y se cuantificó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA.

B- TITULACIÓN DE TNF- α EN BASE A UN ENSAYO BIOLÓGICO SOBRE CÉLULAS L-929.

La presencia de TNF- α se determinó en base a un ensayo biológico sobre la línea celular de fibroblastos murinos L-929.¹⁷¹ Esta línea celular fue mantenida en crecimiento exponencial en presencia del medio RPMI 1640, suplementado con SFB (10%), glutamina (2 mM) y gentamicina (50 μ g/ml). Se realizaron dos repiques semanales en una proporción 1/10 y las células se mantuvieron a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂. Se utilizó para la titulación de TNF- α .

Células L-929 en crecimiento exponencial se suspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y gentamicina (50 µg /ml). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (2x10⁵ células/pocillo) y se incubaron a 37° C durante 18 hrs para permitir la adherencia de las células. Luego se agregaron 100µl de las muestras a titular en diluciones seriadas y actinomicina-D (5 µg/ml) a cada pocillo. Paralelamente se realizaron controles positivos de citotoxicidad con TNF-α rm (0.5 pg/ml - 1 ng/ml). Los controles negativos de lisis celular (0% de lisis celular) recibieron 100µl de medio de cultivo. Las placas fueron incubadas durante 24 hrs a 37° C. Posteriormente se descartaron los sobrenadantes y las células muertas despegadas, se tiñeron las monocapas remanentes con violeta de genciana (0.05% en metanol 20%), y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El exceso del colorante fue removido por lavados repetidos con agua. Posteriormente las células teñidas se despegaron por el agregado de 50 µl de ácido acético 33% y una leve agitación. Finalmente se determinó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (Organon Técnica, Argentina).

La presencia de TNF-α resulta citotóxica hacia esta línea celular. Por esta razón, la medida de la lisis celular es una medida semi-cuantitativa del nivel de TNF-α presente en la muestra. Los valores se expresan como U/ml. Las Unidades (U) representan la dilución a la cual se obtenía el 50% de lisis.

MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-2 (MIP-2) E IL-6. Las concentraciones de ambas citoquinas se midieron espectrofotométricamente utilizando *kits* comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante.

5-FUNCIONES DE DEFENSA DE LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Las células se sembraron a una densidad de 10^6 células/ml y se incubaron a 37°C durante 2 hrs. Posteriormente se removieron las células adheridas y se agregó medio fresco con suspensiones de partículas ($250\text{ }\mu\text{g/ml}$) en presencia y ausencia de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ LPS y/o L-NAME (1mM) durante 24 hrs.

GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO.

Se utilizó la técnica de reducción del Nitroblue Tetrazolium (NBT).¹⁷² Esta reacción permite evaluar la magnitud del estallido respiratorio mediante la cuantificación de la formazana depositada intracelularmente luego de la reducción del NBT por el anión superóxido. Este puede ser generado por exposición al MP o por estímulo con TPA.

En el primer caso se evaluó la capacidad del MP de generar ROS: cultivos de MA (10^6 cél /cápsula) se incubaron a 37°C en presencia de NBT (0.1% en PBS) y de MP ($250\text{ }\mu\text{g/ml}$) y/o del antioxidante DMTU (10mM) durante una hora.

En el segundo caso se evaluó en los MA que habían fagocitado MP la capacidad de generar ROS como respuesta a un segundo estímulo: MA (10^6 cél /cápsula) se incubaron durante 24 hrs en presencia del MP ($250\text{ }\mu\text{g/ml}$) a 37°C . Finalizada la incubación las células se lavaron con PBS, se agregó NBT (0.1% en PBS) y TPA ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$ en acetona) y se incubaron a 37°C (CASO A).

En el segundo caso, luego de las 24 hrs de incubación con el MP, las células se lavaron con PBS, se agregó medio fresco y se incubó a 37°C durante 24 hrs más. Posteriormente se realizó el ensayo de NBT como esta descrito anteriormente para el CASO A (CASO B)

En ambos casos, finalizada la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se cuantificó el ensayo mediante observación al microscopio óptico. Los valores se expresaron como porcentajes de células reactivas.

GENERACION DE NITRITOS

La generación de nitritos se utilizó como medida indirecta de la generación de NO. Cultivos de MA (10^6 cél/cápsula) se incubaron durante 24 hrs a 37°C en presencia de MP (250 µg/ml) y en presencia o ausencia de un estimulante (LPS-1 µg/ml) y de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME -1 mM). Finalizada la incubación se recolectaron los sobrenadantes.

Para la determinación de nitritos se mezclaron alícuotas de los sobrenadantes celulares con volúmenes iguales del reactivo de Greiss (1% sulfanilamida; 0.1% naftil-etilendiamina) y se incubaron a temperatura ambiente durante diez minutos. Se cuantificaron espectrofotométricamente (540 nm). Los valores de nitritos generados por el metabolismo del óxido nítrico se calcularon mediante una curva estándar con nitrito de sodio.¹⁷³

ANÁLISIS DE IMÁGENES DEL MP INCORPORADO POR LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Esta metodología se utilizó para calcular el área de MP incorporada por MP. Se adquirieron imágenes de macrófagos provenientes del BALF de ratones instilados con MP (5mg/kg) por microscopía óptica (Zeiss Axiotron MPM 800). El área ocupada por las partículas y el área celular libre remanente se determinaron utilizando un programa desarrollado en el Laboratorio LANAIS-CONICET, Unidad de Actividad Radiobiología, CNEA.

Se calculó el Índice Fagocítico (IF) como el porcentaje de células que incorporaron MP. Dado que el área de los macrófagos es uniforme. Los valores se expresaron como la media $\pm$ ES del área celular ocupado por MP /célula.

6-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron cinco animales por grupo, mientras que para los experimentos *in vitro* se tomaron valores de cinco experimentos independientes. Los valores se expresaron como la media $\pm$ ES. Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las comparaciones se realizaron con el test de Mínima Diferencia Significativa, y el error α se estableció en 0.05. En algunos casos se realizaron comparaciones de a pares utilizando la prueba T de Student. Se utilizó el programa STATISTICA.

RESULTADOS

SECCIÓN I: Material Particulado

1-CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DEL MP

1.1-MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE CARBÓN: CFA

Luego de la combustión del carbón llevada a cabo a escala de laboratorio, las cenizas remanentes, *coal fly ash* (CFA), fueron fraccionadas según su diámetro aerodinámico en fracciones *gruesas* (C-*coarse*), *fina* (F-*fine*) y *ultrafina* (UF). Para su estudio se contó con muestras de CFA provenientes de la combustión de carbón de distinto origen geográfico (Tabla I.1)

CARBON	RANGO	LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	FRACCIONES DISPONIBLES
MONTANA (M)	Sub-bituminoso	Oeste de USA	Gruesa-Coarse (M C)
			Fina -Fine (M F)
			Ultrafina (M UF)
WESTERN KENTUCKY (WK)	Bituminoso	Este de USA	Gruesa-Coarse (WK C)
			Fina-Fine (WK F)

Tabla I.1: fracciones de CFA empleadas en este estudio

COMPOSICIÓN ELEMENTAL

El análisis de cada fracción del CFA (UF, F y C) realizado mediante EDX reveló las diferencias en la composición elemental de las mismas (Tabla I.2). Las fracciones F y C de ambos tipos de carbón están constituidas principalmente por aluminosilicatos y se diferencian entre si por el contenido de otros elementos. Por ejemplo, las fracciones provenientes de WK presentan altos contenidos de Fe y Zn, con valores muy superiores a los

encontrados en las fracciones de Montana. En la Tabla I.2 se incluyen datos referentes a otros elementos y al contenido de carbono de las fracciones F y C. Es de destacar el bajo contenido de carbono presente en estas fracciones, lo cual indica que se trata de partículas "no carbonosas".

Por otro lado, las partículas M UF, a diferencia de la fracciones F y C, están enriquecidas particularmente en S y en trazas de diversos elementos (Ba, P, Sr, V, Nb, Cd, Se, Ga, Cu) careciendo de los elementos Si, Al, Fe, Mg y Ti.

Las microfotografías electrónicas de barrido confirman el tamaño de las partículas que componen las diferentes fracciones y demuestran la efectividad de las técnicas de separación empleadas (Figuras 1.1, 1.2 y 1.3).

Tabla I.2: concentraciones de trazas de elementos en las diferentes fracciones:
Montana (M) y W Kentucky (WK)¹⁷⁴

Elementos	M UF	M F	M C	WK F	WK C
	mg/ g CFA	mg/ g CFA	mg/ g CFA	mg/ g CFA	mg/ g CFA
Si	28.500	156.742	222.875	194.800	210.850
Al	9.370	103.979	108.800	104.900	102.525
Ca	82.900	89.858	115.175	4.108	3.403
Fe	6.920	53.929	30.350	135.800	143.350
Na	-	2.624	2.265	1.480	1.275
S	39.400	7.070	9.130	9.438	5.373
Mg	14.600	27.721	31.300	5.120	5.018
Ti	1.845	6.353	6.180	6.448	5.485
K	1.155	9.358	5.660	17.100	15.725
Cl	659	1.264	1.460	1.107	1.075
Ba	16.200	2.298	1.843	247	247
P	10.530	1.080	979	618	406
Sr	7.480	3.426	3.858	141	114
Zr	-	332	410	213	214
V	712	208	108	361	333
Ni	330	347	-	72	47
Nb	910	176	22	24	20
Mn	487	1.048	907	138	126
Cd	1.620	463	-	-	19
Se	565	136	-	44	20
Ga	460	83	27	52	26
Cu	420	320	77	96	64
Zn	-	456	67	780	391
Ge	-	137	19	256	112
Y	-	296	42	77	57
Co	-	57	-	116	110
Mo	-	79	43	125	63
Br	-	27		80	29
Sc	-	29	36	20	20
Sn	-	27	28	-	-
Pb	-	79	41	55	-
Elementos	22,5	47,0	54,1	48,3	49,6
%					
Oxígeno %	16,4	44,5	45,2	40,2	41,4
Carbono %	-	0,4	0,5	11,2	8,8
ND%	61,0				
Total %	100,0	91,9	99,9	99,9	99,9

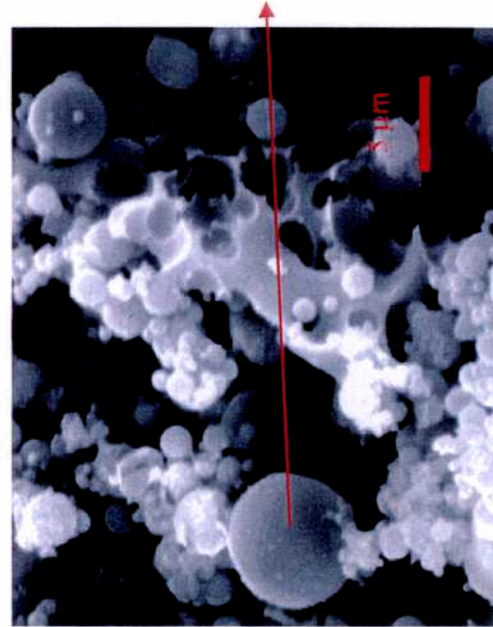
MONTANA COARSE



Elementos	%
Al	35,4
Si	57,5
Ca	4,4
Fe	2,6

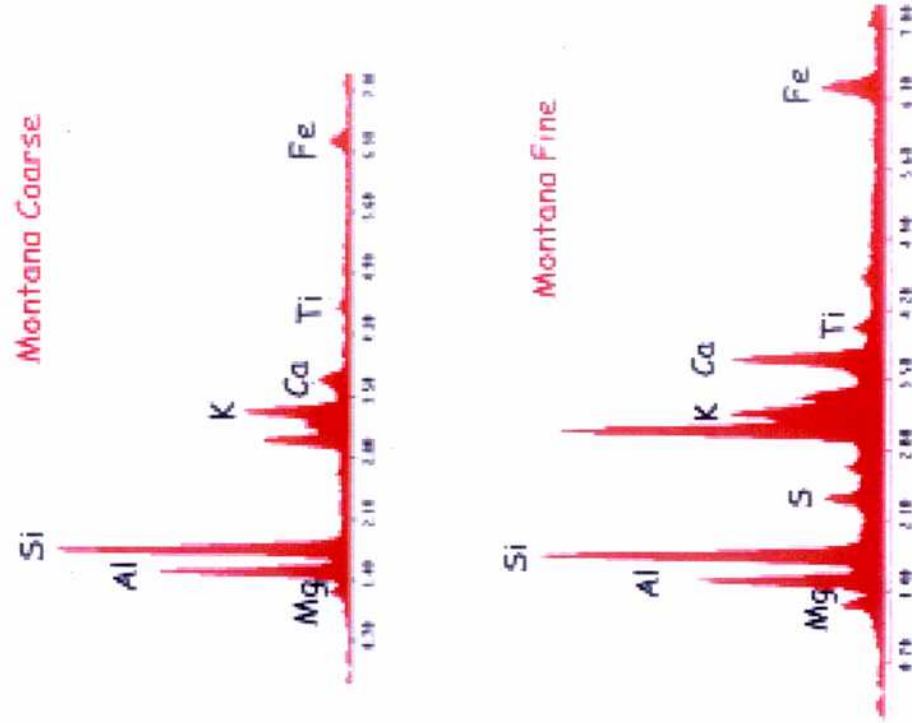
Elementos	%
Mg	3,1
Al	25,1
Si	46,7
K	14,9
Ca	3,7
Ti	1,1
Fe	5,2

MONTANA FINE

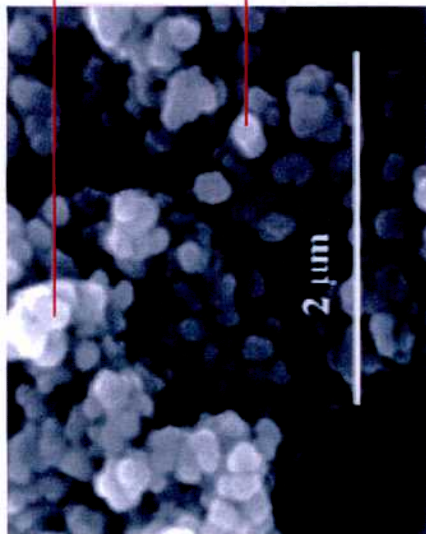


Elementos	%
Mg	3,0
Al	26,2
Si	41,3
S	2,1
K	7,7
Ca	4,6
Ti	2,0
Fe	12,8

Figura 1.1: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX de las fracciones MC y MF



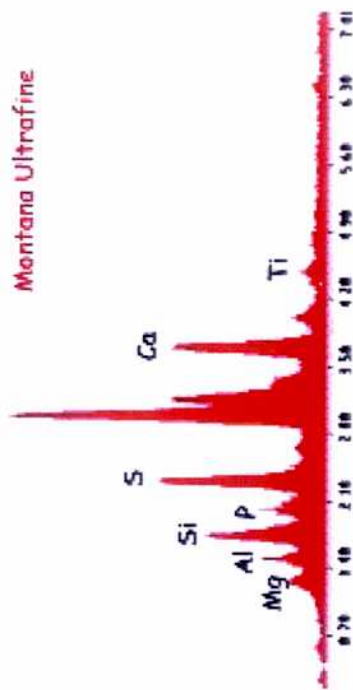
MONTANA ULTRAFINE



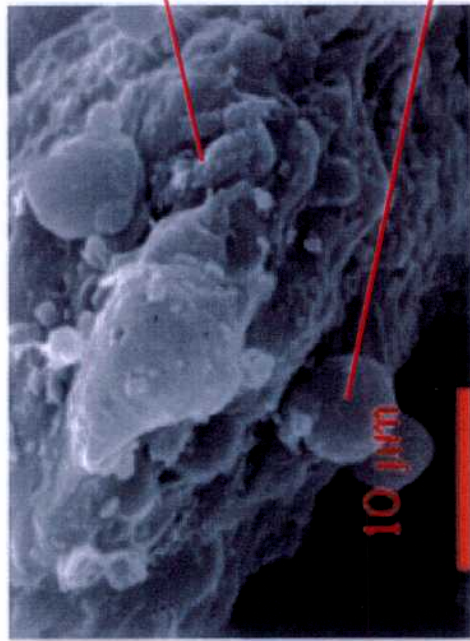
Elementos	%
Mg	12,2
Al	18,6
S	31,2
Ca	37,9

Elementos	%
Mg	9,6
Al	9,6
Si	18,5
K	8,7
S	24,9
Ca	23,9
Ti	4,5

Figura 1.2: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX) de la fracción M UF

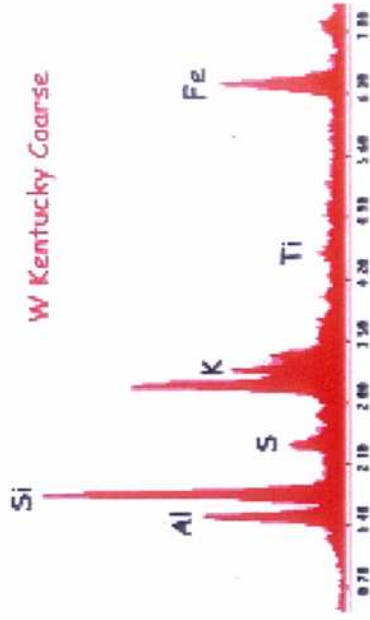


W KENTUCKY COARSE

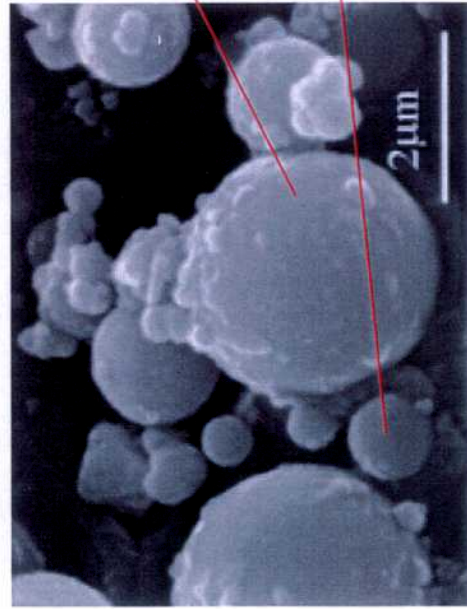


Elementos	%
Al	13.8
Si	22.3
S	42.3
Fe	21.5

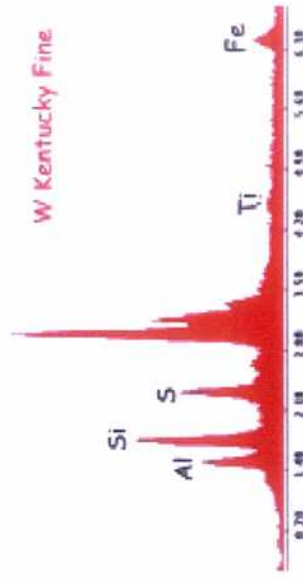
Elementos	%
Al	17.74
Si	42.27
S	3.74
K	13.96
Ti	2.15
Fe	20.13



W KENTUCKY FINE



Elementos	%
Al	19.6
Si	37.6
S	29.3
Ti	2.4
Fe	11.02



Elementos	%
Al	25,0
Si	26,4
S	9,2
Ti	1,1
Fe	38,3

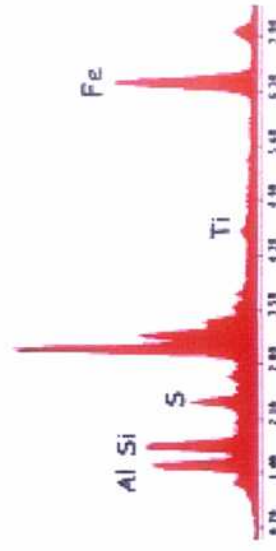


Figura 1.3: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental, representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX

CARACTERIZACION DE LA MATRIZ POR DRX

El análisis mediante DRX permitió confirmar que se trata de aluminosilicatos, con muy bajo contenido de carbono (excepto MUF)

A-MONTANA

Al comparar las muestras provenientes de la combustión del carbón de Montana por medio de DRX, observamos que MC y MUF son muy diferentes entre sí, mientras que en MF encontramos algunos componentes comunes a ambas muestras. En los tres diagramas de difracción se observa una concentración relativamente baja de una fase amorfa por la presencia de una elevación en la línea de base en la zona $20^\circ < 2\theta < 35^\circ$ (Figura 1.4).

En la Figura 1.5 observamos que MUF esta constituida mayoritariamente por sulfato de Ca.

En la Figura 1.6 podemos confirmar que las fracciones C y F presentan un importante contenido de cuarzo (SiO_2) y también cantidades apreciables de mullita ($\text{Al}_6\text{Si}_2\text{O}_3$)

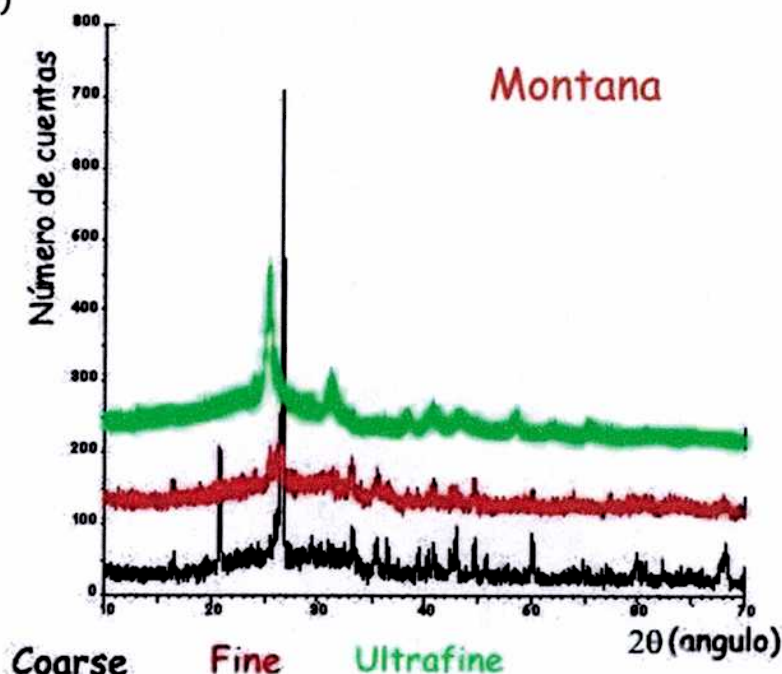


Figura 1.4: diagramas de difracción de las fracciones MC, MF y MUF

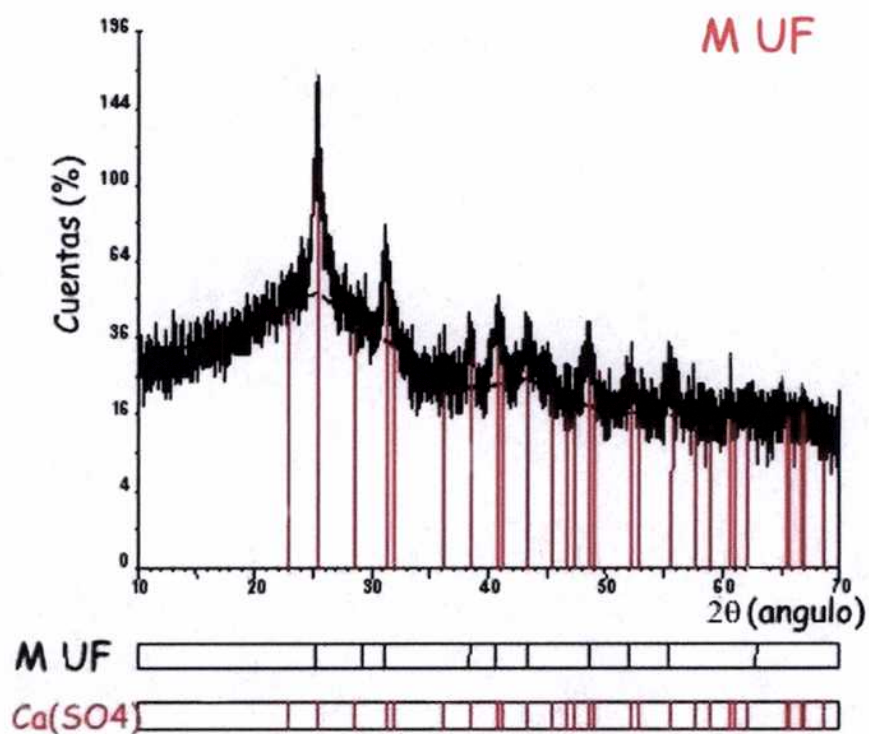


Figura 1.5: identificación de las reflexiones obtenidas en el diagrama de difracción de la fracción MUF.

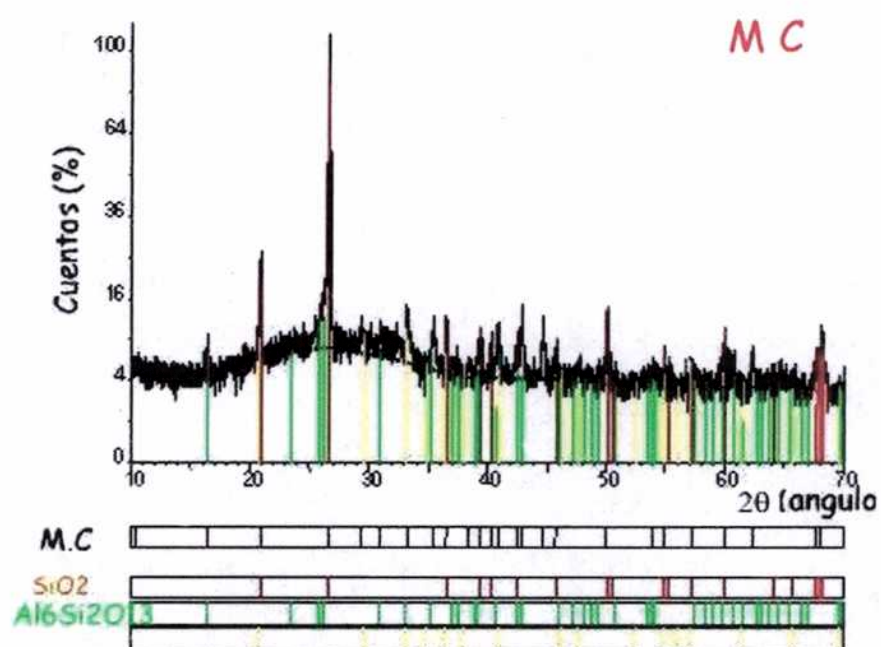


Figura 1.6: identificación de las reflexiones obtenidas en el diagrama de difracción de la fracción MC,

B-WESTERN KENTUCKY

WKF y WKC son muy similares entre sí (Figura 1.7). Están compuestas mayoritariamente por sílice (SiO_2), en forma de cuarzo, y aluminosilicatos de Ca, Mg y Fe. La diferencia fundamental es la presencia de abundante Fe metálico en WK F (Figura 1.5), representada por una reflexión de intensidad importante en la zona $2\theta < 45^\circ$. En WKC se observa la presencia de titanato de Ca y óxido de hierro (Figuras 1.8 A y B). En las dos fracciones se observa una fase amorfa (idem Montana).

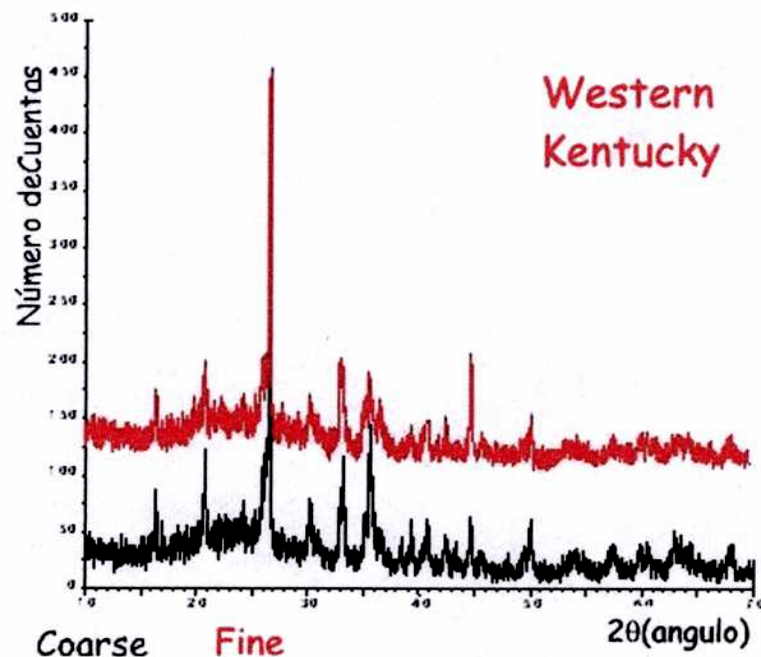


Figura 1.7: diagramas de difracción de las fracciones WKC y WKF

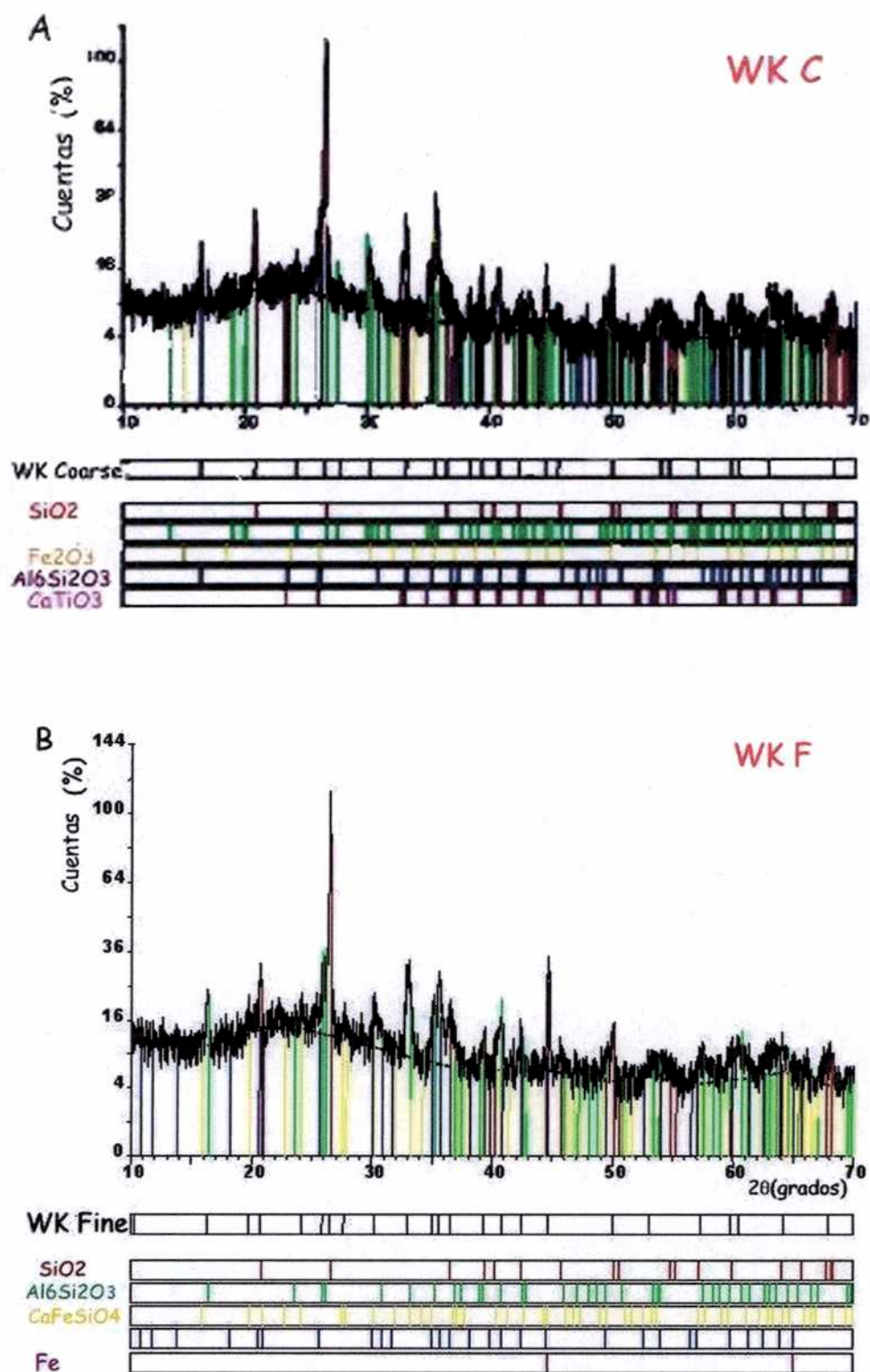


Figura 1.8: identificación de las reflexiones obtenidas en los diagramas de difracción de las fracciones WKC(A) y WKF(B)

1.2-MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO.

1.2.1-COQUE

Luego de un episodio accidental de emisión de MP en una zona de la Provincia de Buenos Aires, se recolectaron en el suelo de viviendas cercanas a una coquería, en dos lugares diferentes, dos muestras ambientales (6110 y 6301). A fin de determinar la procedencia del MP de las muestras ambientales y dado que existía una alta probabilidad de que estas muestras contuvieran coque, se realizó un análisis mediante DRX y EDX comparando las muestras obtenidas en la coquería (coque calcinado y coque crudo) y las muestras recolectadas en las viviendas.

COMPOSICIÓN ELEMENTAL

MUESTRAS PROVENIENTES DEL ESTABLECIMIENTO INDUSTRIAL

A nivel morfológico se aprecia que la mayoría de las partículas de coque crudo presentan superficies lisas (Figura 1.10-A) mientras que las partículas de coque calcinado presentan poros (Figura 1.10-B)

Ambas muestras de coque (crudo y calcinado) presentan un importante contenido de S (Figura 1.10-A y B). También se detectaron Al, Si, Ca y Fe, que son elementos mayoritarios de la tierra.

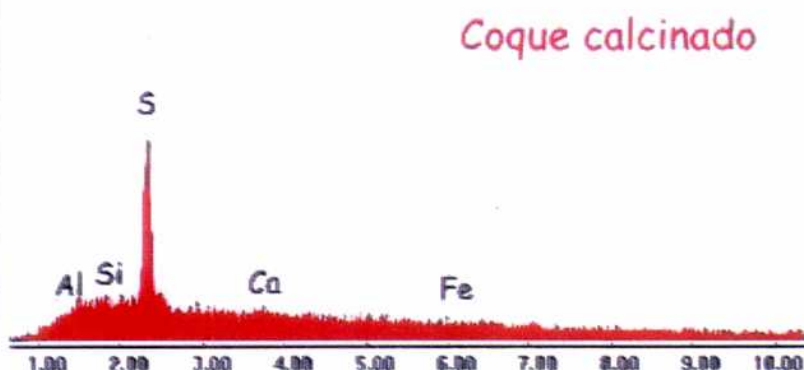
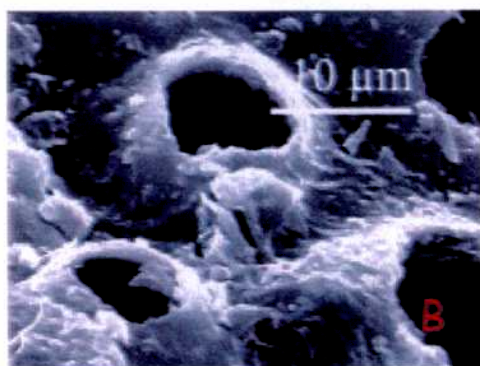
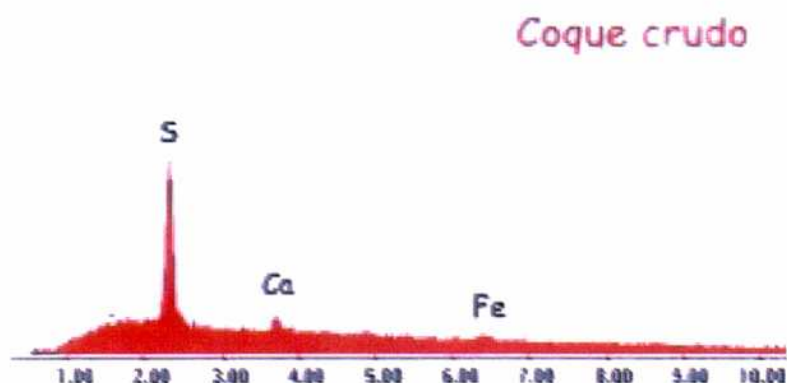
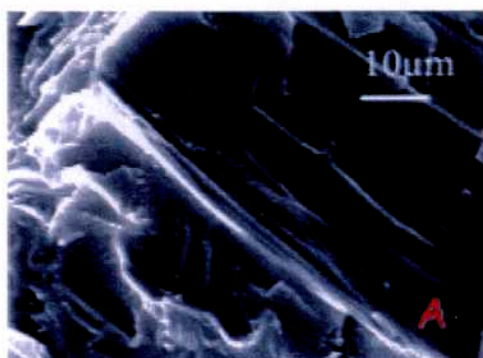


Figura 1.10: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX de las muestras patrón: coque crudo (A) y coque calcinado (B).

MUESTRAS AMBIENTALES RECOLECTADOS EN VIVIENDAS CERCANAS AL ESTABLECIMIENTO INDUSTRIAL

Debido al alto contenido de azufre presente en las muestras de coque provenientes del establecimiento industrial se empleó azufre (S) como trazador para identificar coque en las muestras recolectadas en las viviendas, para su análisis mediante EDX. Los espectros de energía indican que ambas muestras ambientales presentan partículas con S. Además en la muestra 6110

observamos partículas que presentan un pico importante de Si (Figura 1.11-A), mientras que en la 6301 (Figura 1.11-B) observamos un pico importante de Ca, Al y Fe indicando que ambas muestras presentan partículas del suelo.

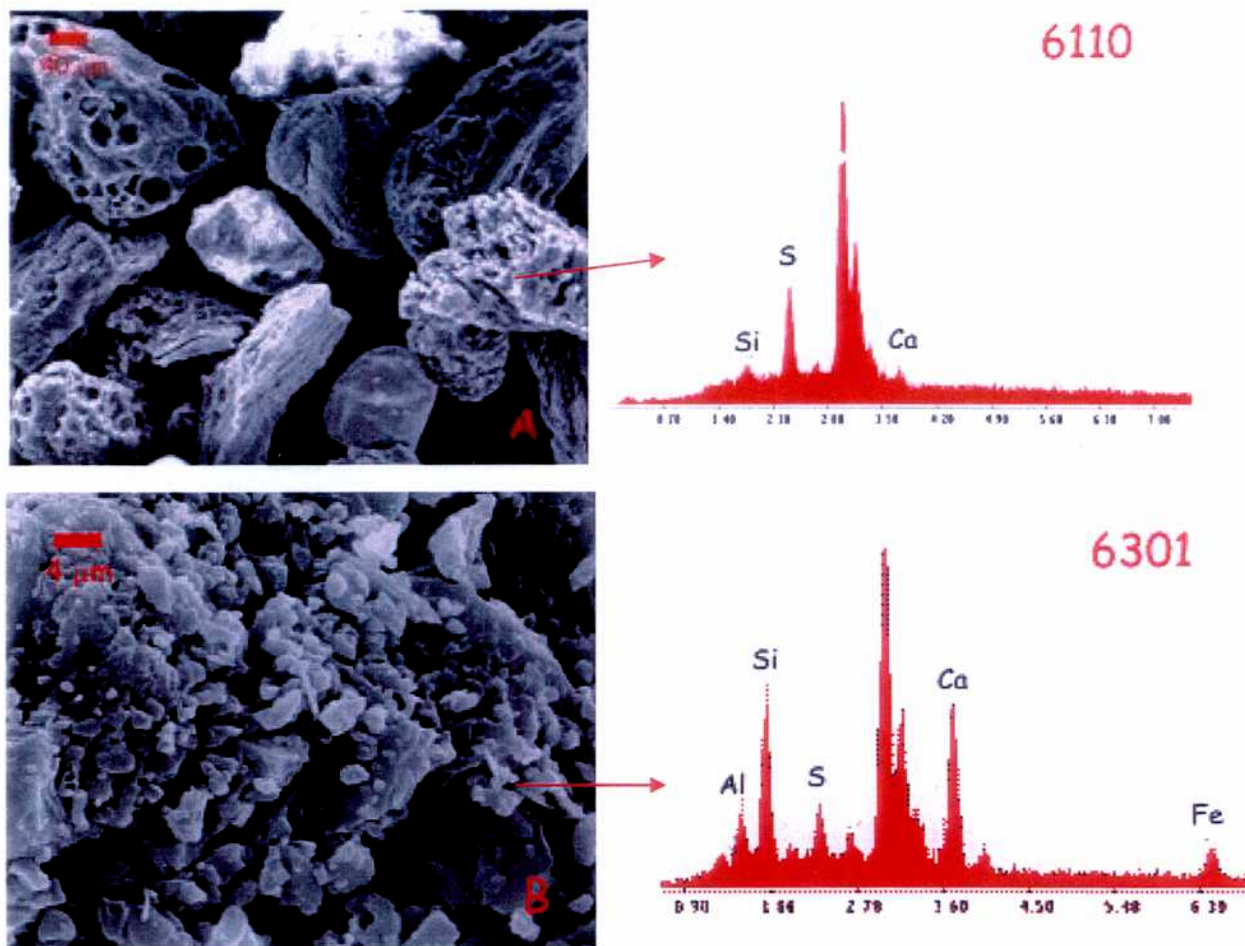


Figura 1.11: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX de las muestras ambientales 6110 (A) y 6301(B) recolectadas en las viviendas.

CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE COQUE POR DRX

MUESTRAS PATRÓN PROVENIENTES DEL ESTABLECIMIENTO INDUSTRIAL

En la Figura 1.12 se muestran los diagramas de difracción del coque crudo y el coque calcinado. El coque crudo presenta un típico patrón de difracción de una muestra amorfa: un máximo muy ancho en la zona de bajo ángulo y una sola reflexión muy ancha y de baja intensidad en $2\theta = 25^\circ$.

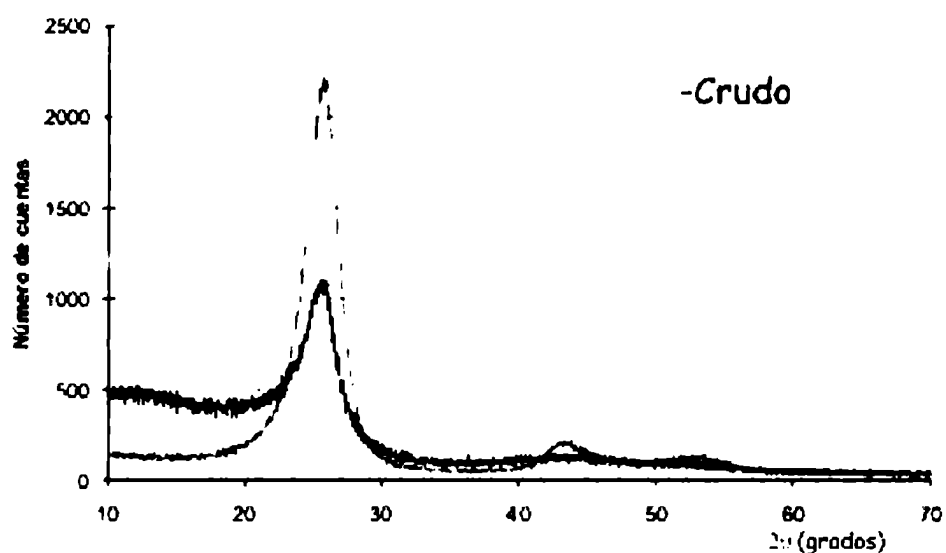


Figura 1.12: diagramas de difracción del coque crudo y calcinado

El coque calcinado, es más cristalino y su análisis de identificación permite comprobar que las reflexiones se corresponden con el carbono (ficha 41-1487) indicando un contenido importante de grafito (Figura 1.13.)

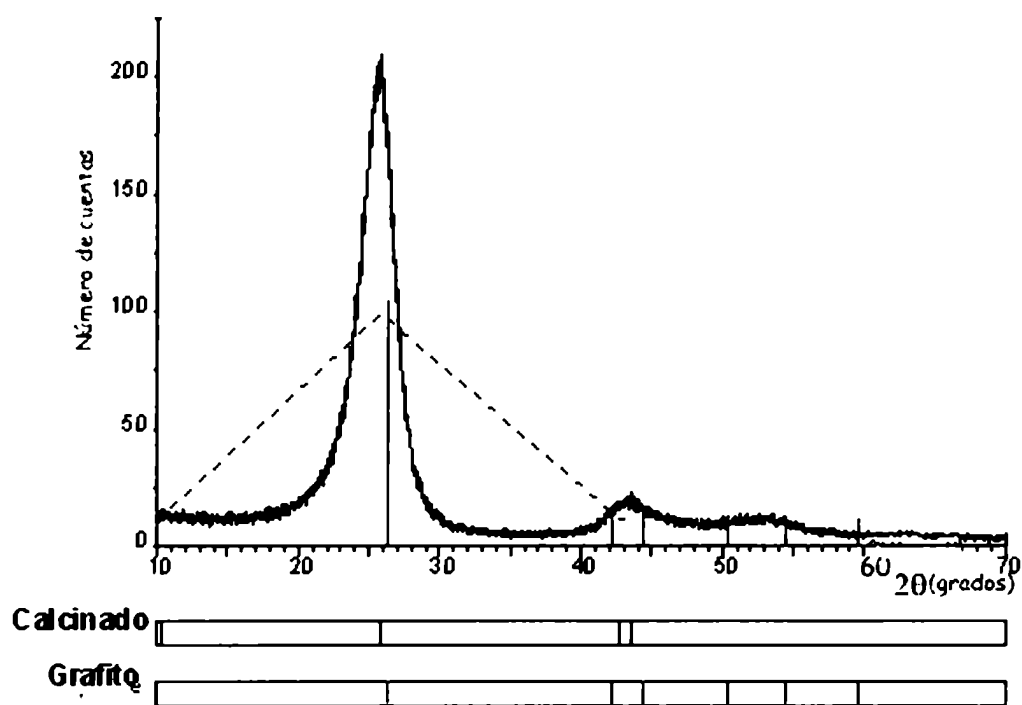


Figura 1.13: comparación de las reflexiones de coque calcinado con las del carbono

Se prepararon mezclas con proporciones conocidas de las muestras de la coquería a fin de identificar coque crudo ó coque calcinado en las muestras ambientales. Los diagramas de difracción correspondientes a estas mezclas indican que a medida que el porcentaje de coque calcinado aumenta, la intensidad del fondo decrece y la intensidad del pico aumenta proporcionalmente (Figura 1.14). Hay dos zonas en el diagrama de difracción que permiten hacer una evaluación de porcentajes de coque crudo y calcinado: 1) la zona de bajo ángulo y 2) la zona de la reflexión intensa ($2\theta = 25^\circ$). En ambos casos el comportamiento entre el número de cuentas y el porcentaje de calcinado es prácticamente lineal, de manera que es posible utilizar cualquiera de las dos zonas para la cuantificación del aporte de cada una de estas fuentes en una muestra ambiental.

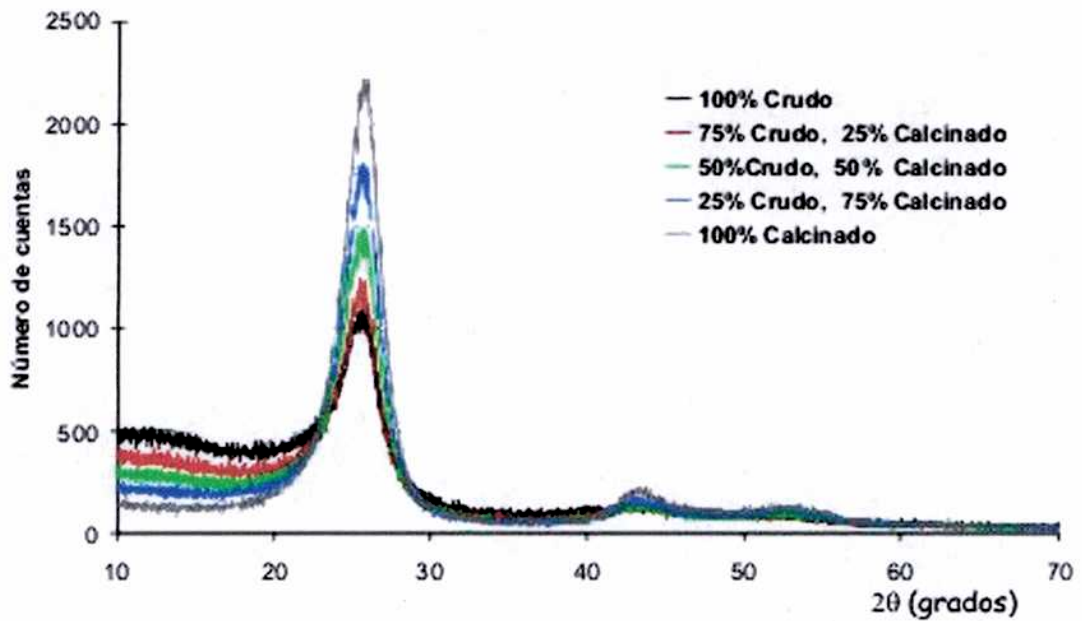


Figura 1.14: diagramas de difracción para muestras preparadas con distintas proporciones de las fuentes de emisión.

MUESTRAS AMBIENTALES RECOLECTADAS EN VIVIENDAS CERCANAS AL ESTABLECIMIENTO INDUSTRIAL

La Figura 1.15 indica que la muestra 6110 está constituida mayoritariamente por coque calcinado.

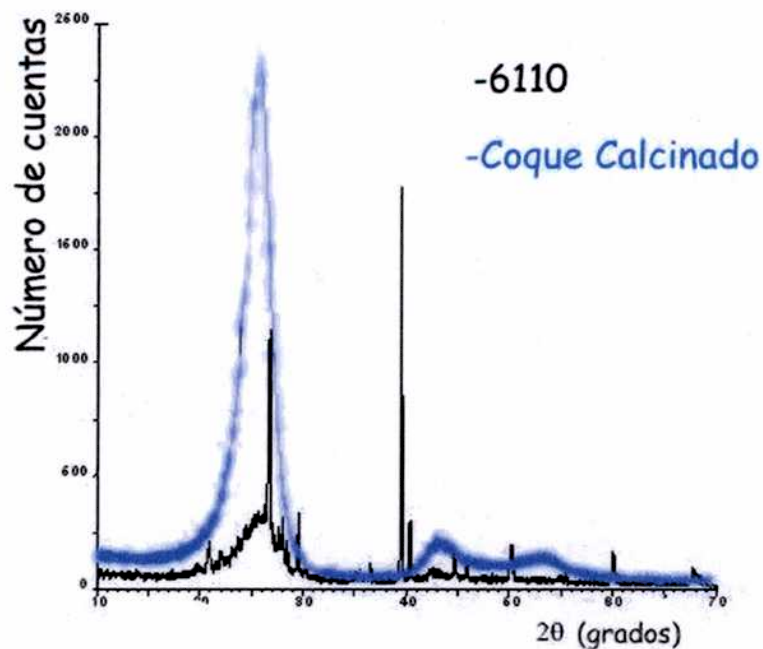


Figura 1.15: diagramas de difracción de la muestra 6110 y 100% de coque calcinado.

La figura 1.16 indica que la muestra 6301 tiene una composición cercana a 60% crudo-40% calcinado.

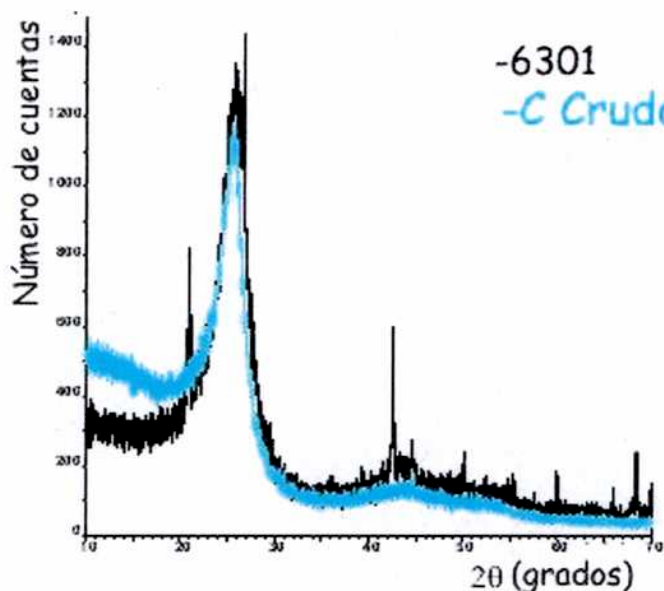
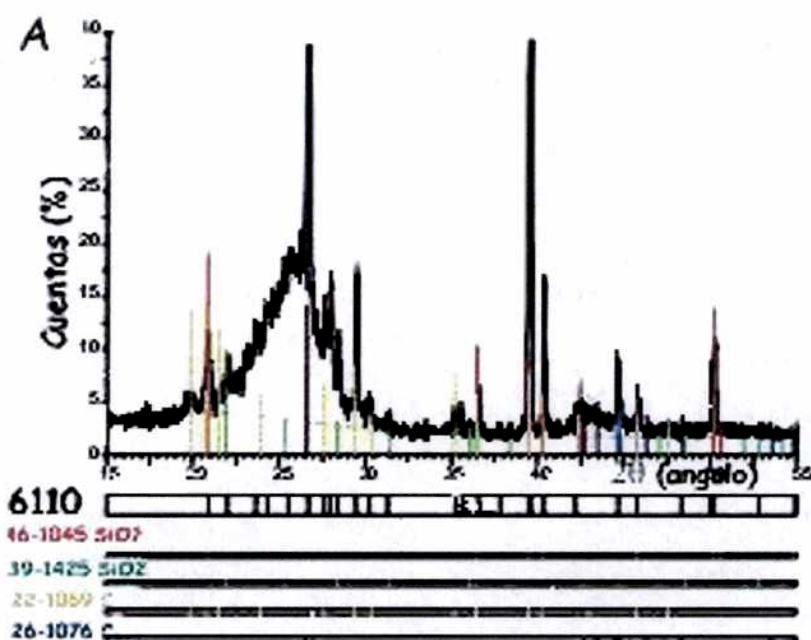


Figura 1.16: diagramas de difracción de la muestra 6301 y de 100% del coque crudo

La figura 1.17 indica la presencia de SiO_2 en ambas muestras. Estas fueron recogidas del suelo de las viviendas y presentan una mezcla de tierra, arena, etc. La muestra 6110 tiene mayor proporción de sílice que la 6301.



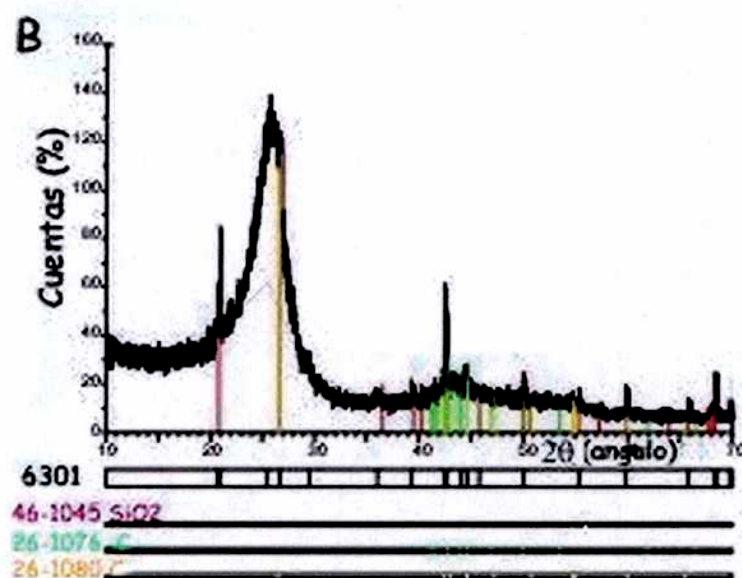


Figura 1.17: identificación de las reflexiones obtenidas en los diagramas de difracción de la muestra 6110 (A) y 6301 (B)

Para mayor simplificación en la expresión de los resultados biológicos nos vamos a referir a las muestras como se indica en la Tabla I.3

<i>MUESTRAS AMBIENTALES</i>	<i>Características</i>
A (6110)	-mayoritariamente coque calcinado -mayor proporción de SiO ₂ (presenta partículas de suelo)
B (6301)	-60 % crudo-40% calcinado
sA	-Muestra de suelo proveniente de la muestra A (alta proporción de sílice)

Tabla I.3: muestras ambientales de coque empleadas en este estudio

1.2.2-MUESTRA URBANA

En la microfotografía electrónica observamos que se trata de partículas *fine*. El análisis de la composición elemental indica que presenta un contenido bajo pero apreciable de elementos de la tierra (Al, Si, Ca) así como también K y Ti.

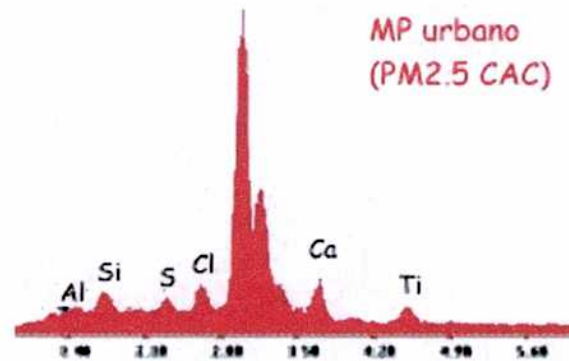
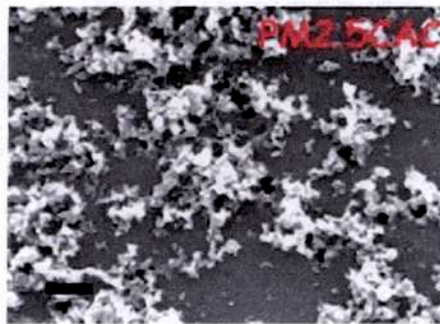


Figura 1.18: microfotografías electrónicas de barrido y composición elemental representada mediante espectros de energía (intensidad de pico en función de energía en KeV) obtenidos por EDX) de la muestra urbana recolectada en el CAC. Barra equivale a 5 μm

SECCIÓN II: Impacto biológico de los contaminantes del Aire

1- EFECTOS BIOLÓGICOS DE MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE CARBÓN: CFA

1.1-EFECTOS *IN VIVO*

En esta sección se analizan los efectos de la instilación intratraqueal de masas iguales de fracciones de CFA (gruesas o *coarse*, finas o *fine* y ultrafinas o *ultrafine*). Particularmente se estudian indicadores de inflamación pulmonar.

El éxito de la instilación intratraqueal se corroboró histológicamente. La Figura 2.1 muestra las trazas de MP depositadas en zonas de las vías aéreas inferiores del ratón.

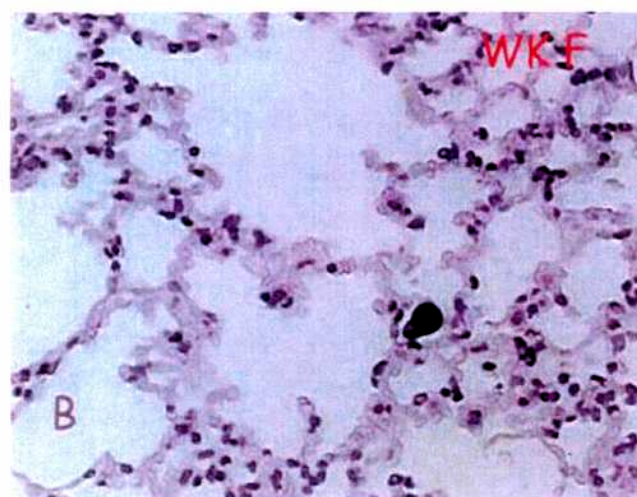
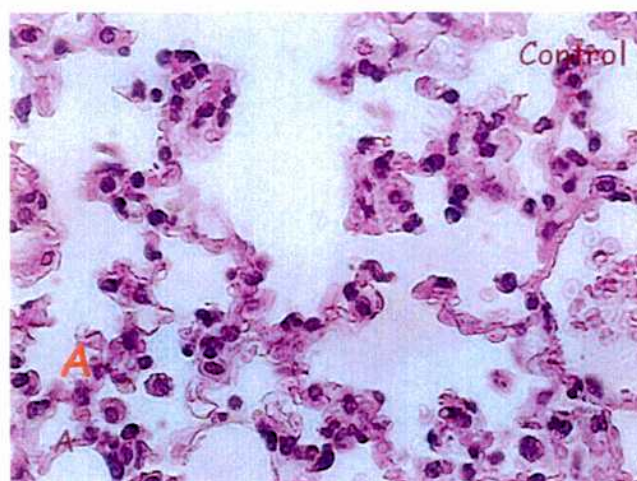


Figura 2.1:

A: corte histológico de pulmón de ratón 18 horas luego de la instilación con solución salina (300 x).

B: idem luego de la instilación de WK F (200 x)

A-ANÁLISIS DE INDICADORES INFLAMATORIOS

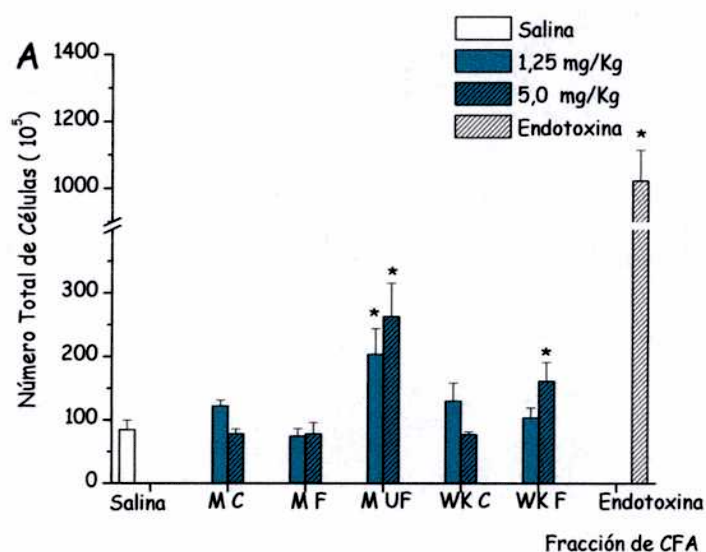
RECuento DIFERENCIAL DE CÉLULAS

Cuando analizamos los efectos de las partículas obtenidas luego de la combustión del carbón de Montana, observamos que la fracción MUF es la que produce un aumento significativo ($p > 0.01$) en el número total de células en BAL tanto a concentraciones bajas (1,25 mg/Kg) como a concentraciones altas (5 mg/kg). Esto se debe a un aumento en el número de PMN. El grupo instilado con MF, si bien no presentó un aumento importante en el número total de células, generó un aumento significativo en el número de PMN (Figura 2.2-A) a expensas de una disminución del número de MA (Tabla II.1).

El grupo instilado con WKF (5mg/Kg) presentó aumentos significativos ($p < 0.01$) en el número total de células (Figura 2.2-A) que se debe principalmente al aumento significativo ($p < 0,01$) en el número de PMN presentes en BAL (Tabla II.1).

Ninguna fracción *coarse* (MC y WKC) produjo cambios significativos con respecto al control en estos parámetros analizados.

Como control positivo y a fin de confirmar la eficiencia de las técnicas de instilación se trató un grupo con endotoxina. El número de células totales en el BAL de estos animales presentó un aumento significativo ($p > 0,001$) en estos parámetros debido fundamentalmente al aumento del flujo de PMN al BAL.



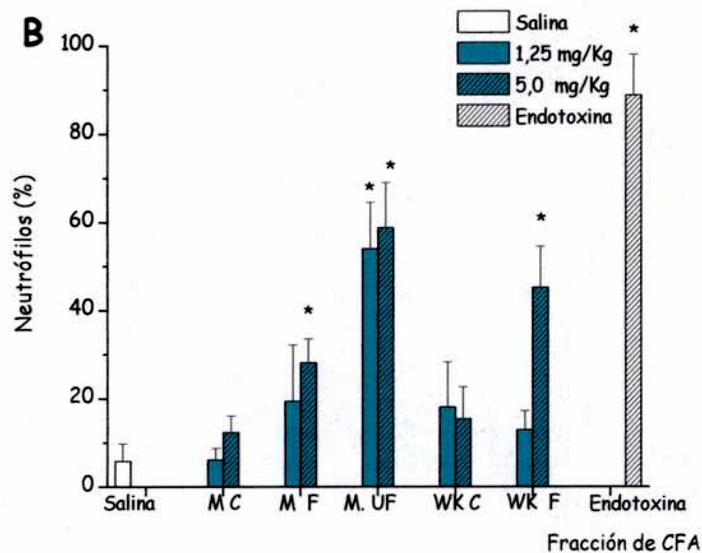


Figura 2.2: A: número total de células (número de células $\times 10^3$ / BALF) y B: Porcentaje de PMN en el BALF 18 horas luego de la IT de CFA (1,25 y 5mg/Kg). Indica diferencias significativas:

*respecto del grupo control ($p < 0,01$)

La Figura 2.3 muestra como la instilación intratraqueal de MUF conduce a una acumulación de PMN en las vías aéreas pulmonares.

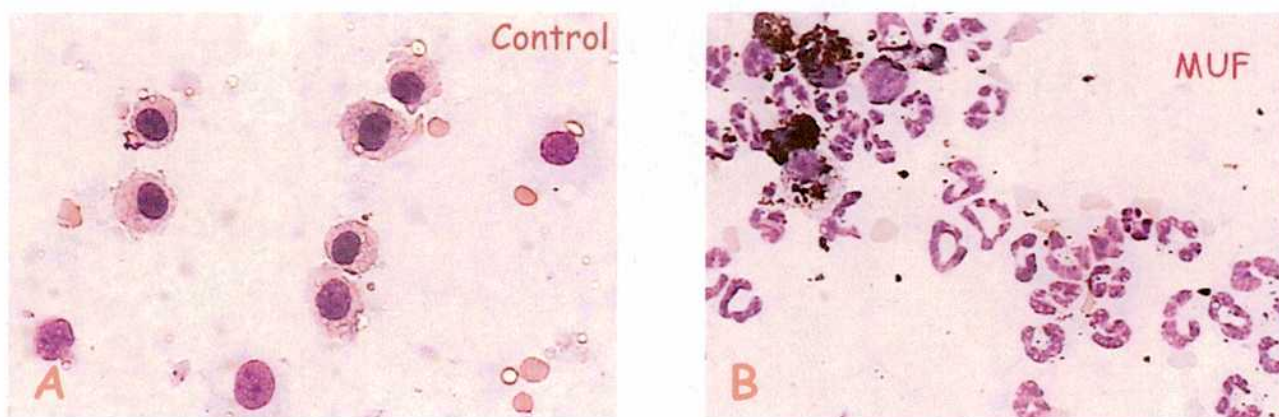


Figura 2.3: A: poblaciones celulares en BAL de animales instilados con solución salina. B: idem instilados con MUF (400x)

CÉLULAS (mg/Kg) MP	PMN		MA		EOSINÓFILOS		LINFOCITOS	
	1,25	5	1,25	5	1,25	5	1,25	5
SALINA	4,3 ± 2,8		82,1 ± 15,0		0,3 ± 0,2		0	
ENDOTOXINA	903,0 ± 124,6*		113,0 ± 101,7		0,9 ± 0,9		5,8 ± 2,1*	
MC	7,9 ± 4,0	10,0 ± 2,8	113,1 ± 7,7	67,7 ± 6,5	0,28 ± 0,28	0,28 ± 0,19	0,4 ± 0,4	0
MF	20,0 ± 15,7	25,3 ± 8,6*	54,4 ± 5,9	50,7 ± 10,0	0,07 ± 0,07	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1*
MUF	122,0 ± 39,0*	172,8 ± 9,6*	76,2 ± 16,2	89,8 ± 6,9	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0	0
WKC	31,9 ± 23,9	12,4 ± 5,7	97,0 ± 17,5	63,8 ± 5,0	0,9 ± 0,8	0,5 ± 0,2	0	0
WKF	15,4 ± 7,9	82,7 ± 22,9*	86,5 ± 9,7	70,8 ± 10,6	1,1 ± 0,5	8,1 ± 4,2	0	0

Tabla II.1: valores absolutos de células (número de células $\times 10^3$ /BALF) 18 horas luego de la IT de CFA (1,25 y 5 mg/Kg). Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 μ g/ratón) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los datos se presentan como la media $\pm$ ES ($n=5$). Diferencias significativas: * respecto del grupo control ($p<0,001$), * entre ambos tipos de carbón para una misma fracción ($p<0,05$), * entre dosis para un mismo tratamiento ($p<0,05$)

INDICADORES BIOQUÍMICOS

La Tabla II.2 muestra los niveles de proteínas totales y de albúmina, actividad LDH y NAG en BAL de animales instilados:

- A. El contenido de proteínas totales resultó significativamente elevado ($p < 0,05$) en los grupos instilados con partículas F (5 mg/Kg).
- B. La concentración de albúmina presentó un significativo aumento ($p < 0,005$) en los grupos instilados con partículas F (5 mg/Kg).
- C. La actividad LDH no resultó significativamente elevada en ningún grupo.
- D. Se encontraron aumentos significativos ($p < 0,005$) en la actividad NAG entre los grupos instilados con ambas fracciones F (5 mg/Kg) y el grupo control. Además el grupo instilado con MUF (1,25 y 5mg/Kg) también presentó aumentos significativos de esta enzima.
- E. El grupo control positivo tratado con endotoxina bacteriana presentó todos los indicadores bioquímicos significativamente elevados ($p < 0,05$) comparados con el grupo control indicando que la técnica de instilación fue exitosa.

PARÁMETROS	ALBÚMINA ($\mu\text{g/mL}$)			PROTEÍNAS TOTALES (mg/mL)			LDH (U/L)			NAG (U/L)		
	1,25	5		1,25	5		1,25	5		1,25	5	
(mg/kg)												
MP												
SALINA												
END,	19,6 $\pm$ 1,1			158 $\pm$ 14,6			62,8 $\pm$ 10,6			1,9 $\pm$ 0,3		
	43,0 $\pm$ 3,0*			481,0 $\pm$ 63,9*			120,2 $\pm$ 16*			7,7 $\pm$ 0,6*		
MC	26,8 $\pm$ 3,9	23,6 $\pm$ 1,7		212,8 $\pm$ 39,3	187,0 $\pm$ 17,9		72,6 $\pm$ 26,4	66,8 $\pm$ 16,5		2,4 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,4	
MF	24,2 $\pm$ 2,6	30,4 $\pm$ 3,7*		188,2 $\pm$ 27,7	233,4 $\pm$ 6,7*		75,8 $\pm$ 2,7	76,2 $\pm$ 15,3		2,3 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,4*	
MUF	24,2 $\pm$ 1,0	25,5 $\pm$ 3,6		204,0 $\pm$ 13,8	219,4 $\pm$ 28,5		65,6 $\pm$ 10,3	74,4 $\pm$ 15,1		3,7 $\pm$ 0,3*	3,9 $\pm$ 0,9*	
WKC	20,2 $\pm$ 1,1	20,6 $\pm$ 1,5		198,8 $\pm$ 9,9	175,8 $\pm$ 9,9		51,4 $\pm$ 4,9	51,4 $\pm$ 9,5		2,2 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,2	
WKF	25,6 $\pm$ 4,8	31,8 $\pm$ 1,1*		237,2 $\pm$ 42,0	295,2 $\pm$ 18,2*		67,0 $\pm$ 19,1	63,2 $\pm$ 12,3		2,8 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,4*	

Tabla II.2: indicadores bioquímicos en BAL 18 horas luego de la IT de CFA (1.25 y 5 mg/Kg). Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 $\mu\text{g/ratón}$) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los valores están expresados como la media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas: * con respecto al control, * entre ambos tipos de carbón para una misma fracción ($p<0,05$) y * entre dosis para un mismo tratamiento ($p<0,05$)

CITOQUINAS

Con respecto a la instilación de muestras de Montana, la instilación de partículas UF (1,25 y 5 mg/kg) produjo un significativo ($p<0,05$) aumento en la liberación de TNF- α al BAL mientras que las fracciones C y F no desencadenaron la liberación de esta citoquina. Los valores de MIP-2 aumentaron significativamente ($p<0,05$) luego de la instilación de UF (1.25 y 5 mg/Kg) y F (5 mg/ml). La fracción C no generó la liberación de MIP-2.

Con respecto a la instilación de muestras de W Kentucky, ninguna de las fracciones produjo efectos en cuanto a la liberación de TNF- α . En cambio un significativo aumento ($p<0,05$) de MIP-2 en BAL se produjo luego de la instilación de partículas F (5 mg/Kg), mientras que el grupo instilado con C no produjo efectos.

Aunque con una importante variabilidad en la respuesta, IL-6 fue detectada en el BAL de los animales instilados con MUF y WKF (Tabla II.3).

Las tres citoquinas resultaron significativamente elevadas en el grupo instilado con endotoxina, demostrando que los ensayos fueron válidos.

En la Figura 2.4 se resumen los resultados arriba descritos.

A IGUALES MASAS INSTILADAS, LAS PARTÍCULAS UF Y LAS F RESULTARON LAS MÁS POTENTES EN EL RECLUTAMIENTO DE PMN Y EN EL AUMENTO EN LOS INDICADORES BIOQUÍMICOS Y CITOQUINAS

CITOQUINA (mg/Kg)	TNF- α (pg/ml)			MIP-2 (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)		
	1,25	5	1,25	5	1,25	5	1,25	5	5
MP									
SALINA		79,0 $\pm$ 9,7		1,35 $\pm$ 0,5			0		
END,		358,2 $\pm$ 71,2*		184,9 $\pm$ 57,4*			1076,9 $\pm$ 136,8		
MC	59,7 $\pm$ 14,8	89,3 $\pm$ 19,7	3,3 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 1,6	0		0		
MF	89,3 $\pm$ 19,7	83,0 $\pm$ 3,61	8,3 $\pm$ 3,6	17,8 $\pm$ 2,5*	2,2 $\pm$ 1,2	0			
MUF	133,1 $\pm$ 31,1	215,0 $\pm$ 76,8*	22,8 $\pm$ 3,1*	37,1 $\pm$ 15,4*	5,3 $\pm$ 3,1	15,5 $\pm$ 10,2			
WKC	97,2 $\pm$ 12,7	86,7 $\pm$ 16,8	5,4 $\pm$ 3,9	8,8 $\pm$ 4,7	0	0			
WKF	41,9 $\pm$ 12,4	71,3 $\pm$ 16,3	4,2 $\pm$ 1,5	40,2 $\pm$ 8,7*	0	15,7 $\pm$ 10,9			

Tabla II.3: niveles de TNF- α , IL-6 y MIP-2 en BALF 18 horas luego de la IT de CFA (1,25 ó 5 mg/kg). Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 μ g/ratón) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los datos se presentan como la media $\pm$ ES (n=5). ND: niveles no detectados. Diferencias significativas: * con respecto al control, * entre ambos tipos de carbón para una misma fracción (p<0,05).

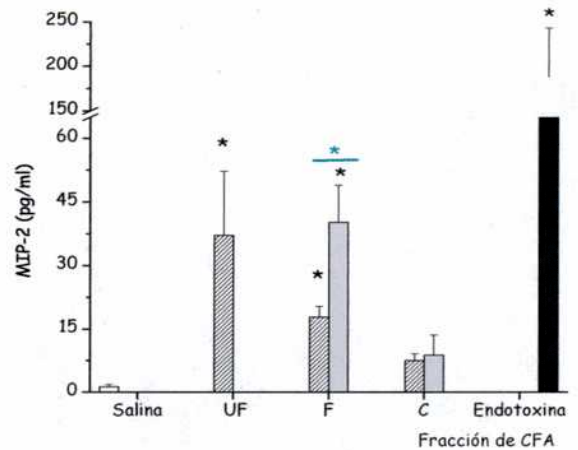
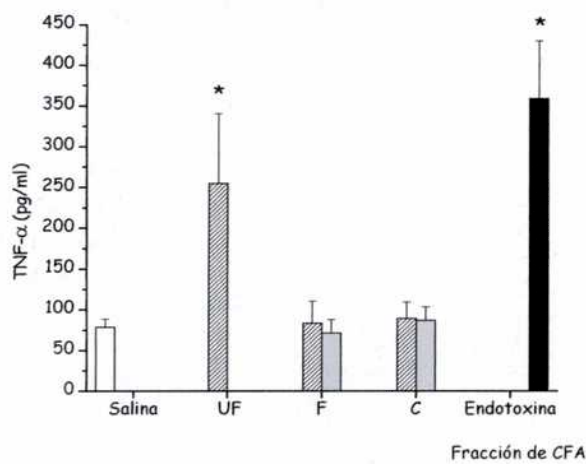
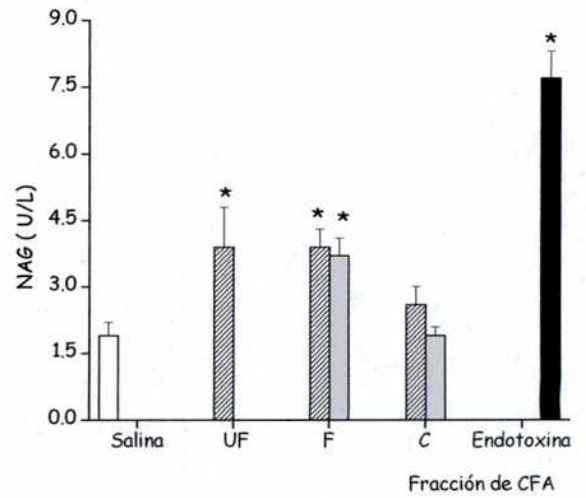
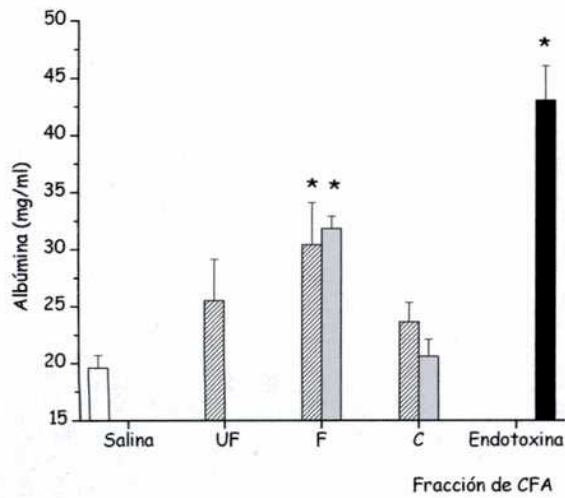
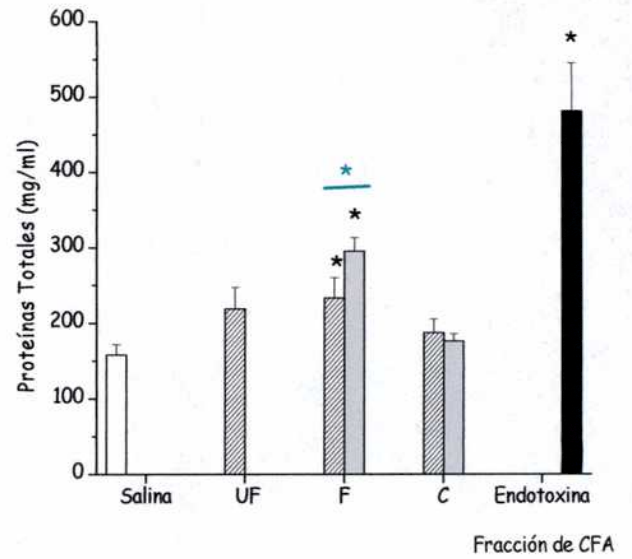
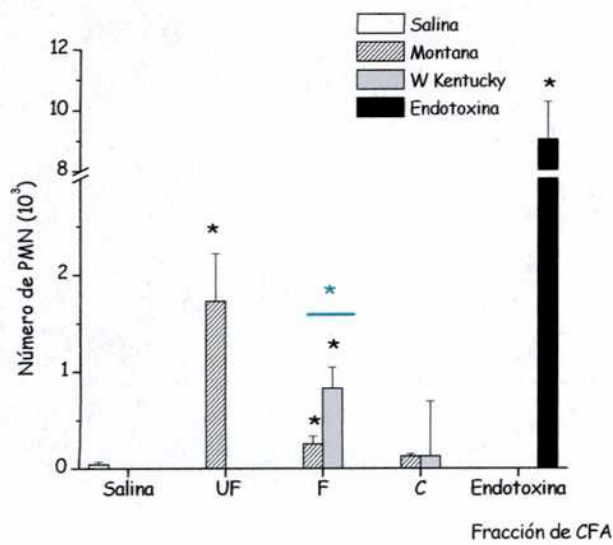


Figura 2.4: resumen de los indicadores de inflamación pulmonar aguda luego de la IT de CFA (5 mg/Kg). Diferencias significativas: * respecto del control, * entre ambos tipos de carbón para una misma fracción ($p < 0,05$)

B-EFECTOS DEL ANTIOXIDANTE DMTU

Debido al alto contenido de Fe de la fracciones WKF se evaluó la posibilidad de que la reacción inflamatoria inducida por WKF estuviera relacionada con la generación de ROS. Para ello se realizaron inyecciones i.p. de DMTU (500 mg/Kg) 30 minutos previos a la IT de las partículas.

RECuento DIFERENCIAL DE CÉLULAS

El grupo pre-tratado con DMTU e instilado con WKF presentó una significativa disminución ($p<0,05$) en el número total de células y de PMN.

Se observó también que en los animales pre-tratados con DMTU e instilados con MUF también hay una disminución de estos indicadores, aunque los resultados no son significativos, mientras que en los instilados con MF hay una disminución significativa ($p<0,05$) en el número de PMN (Tabla II.4).

CÉLULAS	CÉLULAS TOTALES (10^3)		PMN (10^3)	
	Salina	DMTU	Salina	DMTU
MP				
SALINA	100,5 ± 22,5	98,5 ± 15,6	7,9 ± 3,7	20,8 ± 16,4
ENDOTOX	1331,7 ± 247,3*	829,3 ± 91,7*	1180,3 ± 244,8*	680,2 ± 81,6*
MUF	304,7 ± 92,5*	261,3 ± 35,1	225,0 ± 83,2*	154,8 ± 31,3
MF	102,5 ± 75,5	135,2 ± 25,6	60,5 ± 5,3*	26,9 ± 7,2*
WKF	201,4 ± 46,4*	127,0 ± 22,2*	91,7 ± 44,4*	47,4 ± 18,0

Tabla II.4: número total de células y de PMN (10^3 /BAL) obtenido 18 horas luego de la IT de CFA (5 mg/Kg), previo tratamiento con DMTU (500 mg/Kg) ó solución salina. Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 μ g/ratón) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los valores se expresan como media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas: *respecto del grupo control ($p<0,001$), *respecto al correspondiente sin DMTU ($p<0,05$).

INDICADORES BIOQUÍMICOS

El pre-tratamiento con DMTU no modifica los indicadores bioquímicos en los animales instilados con MUF y MF. Sólo en el grupo instilado con WK F se observó una disminución significativa en los niveles de proteínas totales en BAL (Tabla II.5)

No se evaluó el efecto de DMTU en los grupos tratados con las fracciones *Coarse* debido a que estas no generaron efectos inflamatorios importantes.

ENSAYO	ALBÚMINA ($\mu\text{g/mL}$)		PROTEÍNAS TOTALES (mg/mL)		LDH (U/L)		NAG (U/L)
MP	TRAT						
	Salina	DMTU	Salina	DMTU	Salina	DMTU	DMTU
SALINA	23,0 $\pm 6,2$	20,8 $\pm 4,7$	243,0 $\pm 33,6$	247,6 $\pm 50,7$	42,0 $\pm 9,4$	48,2 $\pm 7,5$	1,1 $\pm 0,06$
ENDOTOX	36,2 $\pm 2,5^*$	35,8 $\pm 3,1$	526,2 $\pm 75,9^*$	435,0 $\pm 48,3$	133,4 $\pm 8,2^*$	73,8 $\pm 10,2^*$	6,07 $\pm 1,01$
MUF	25,0 $\pm 4,0$	23,6 $\pm 2,3$	281,8 $\pm 56,3$	298,6 $\pm 74,9$	62,5 $\pm 19,2$	83,0 $\pm 16,5$	3,8 $\pm 0,6$
MF	ND	ND	302,5 $\pm 15,5^*$	298,1 $\pm 22,1$	54,1 $\pm 7,6$	46,3 $\pm 8,5$	ND
WKF	33,2 $\pm 2,7^*$	29,6 $\pm 1,8$	315,2 $\pm 23,2^*$	199,4 $\pm 12,8^*$	65,8 $\pm 9,8$	62,4 $\pm 12,5$	2,1 $\pm 0,3$

Tabla II.5: efecto del antioxidante DMTU (500 mg/kg) sobre los parámetros bioquímicos en BALF 24 horas luego de la IT de las partículas MUF, MF y WKF (5 mg/Kg) Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 $\mu\text{g/ratón}$) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los valores están expresados como la media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas: *entre partículas con respecto de los controles y * entre tratamiento con DMTU y el control. ($p<0,05$)

1.2-EFECTOS *IN VITRO*

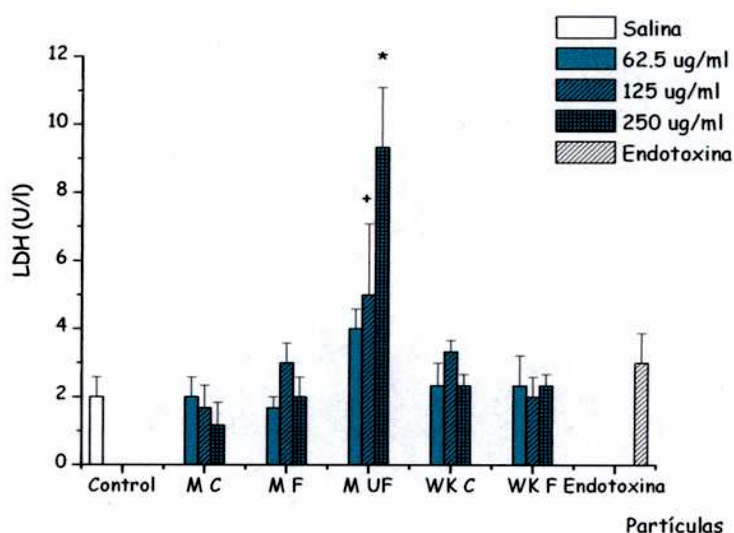
Se llevaron a cabo experimentos con macrófagos alveolares para evaluar si el efecto *in vivo* de los diferentes tipos de partículas podría ser anticipado por ensayos *in vitro*. Por otra parte es de interés estudiar la modulación de las respuestas de defensa de los MA frente a la exposición al MP o a su posterior fagocitosis. Se evaluaron los siguientes parámetros en cultivos primarios de macrófagos alveolares.¹

1-VIABILIDAD

El ensayo de captación de Rojo Neutro indicó que la viabilidad de los MA se mantiene en valores cercanos a los controles luego de la exposición a las fracciones F y C de M y WK para todas las concentraciones ensayadas (62,5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas.

Se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la actividad LDH luego de 4 horas de incubación de MA con concentraciones intermedias y altas de MUF (125 y 250 $\mu\text{g/ml}$). El resto de las partículas no generó cambios (Figura 2.5)

Figura 2.5: actividad LDH en el medio de cultivo de MA luego de 4 horas de exposición a CFA (62,5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$). Los datos se presentan como la media $\pm$ ES ($n=5$). *diferencias significativas respecto del grupo control ($P < 0.05$).



¹ No fue posible evaluar los efectos de MUF debido a la escasa cantidad de esta fracción disponible en la muestra de Montana,

Además, luego de 24 horas de exposición a las partículas, los niveles de LDH no presentaron cambios significativos con respecto al control, excepto para las partículas MUF.

Para los ensayos siguientes se utilizó la concentración mayor de partículas (250 $\mu\text{g/ml}$) debido a que esta concentración no produjo alteraciones en los índices de viabilidad y citotoxicidad.

B-NAG

Se evaluó la actividad NAG como medida de la activación de macrófagos. No se observaron diferencias significativas en los valores de NAG en el medio de cultivo luego de 4 y 18 horas de exposición de los macrófagos a las partículas.

C-CITOQUINAS

-IL-6

Las fracciones F y C no estimulan la liberación de IL-6. La incubación de macrófagos con LPS (control positivo) resultó en un aumento significativo ($p < 0,01$) de la IL-6 con respecto al control (1200 ± 80 y 994 ± 102 pg/ml respectivamente).

-MIP-2

Los niveles de MIP-2 también se midieron en el medio de cultivo celular. Los resultados presentaron alta variabilidad y las diferencias no resultaron significativas.

-TNF- α :

En la Figura 2.5 se observa que todas las fracciones evaluadas estimularon significativamente ($p > 0,05$) la liberación de TNF- α . Se observa que MF es más efectiva que MC. El control positivo con LPS presento un valor de $120,0 \pm 20$.

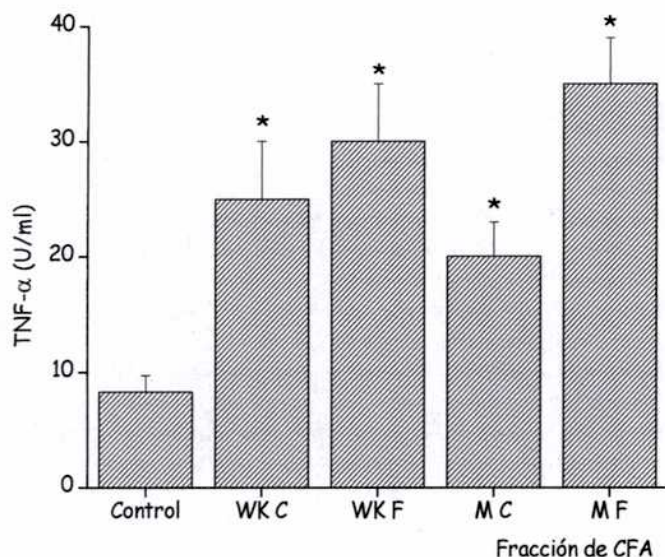


Figura 2.6: TNF- α en el medio de cultivo de MA. Las células se incubaron a 37°C durante 24 horas en presencia de CFA (250 μ g/ml). Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0,05$): *con respecto al control.

D-ESTRÉS OXIDATIVO

-GENERACIÓN DE ROS POR CFA

En la Figura 2.7 observamos que las fracciones MC, MF y WKF producen aumentos significativos ($p < 0,05$) en la generación de ROS en cultivos de MA y que el tratamiento con DMTU revierte parcialmente los efectos observados.

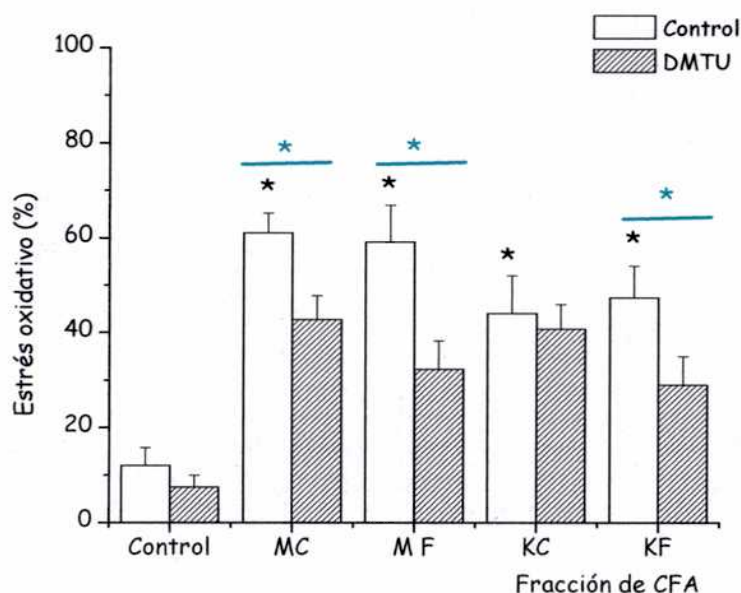


Figura 2.7: cultivos de MA incubados durante 1 hora en presencia de CFA (250 μ g/ml) o solución salina.

Idem y preincubando con DMTU (10mM) o solución salina durante 1 hora.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0,05$):

*respecto del control

*respecto del correspondiente sin DMTU

-RESPUESTA AL ESTÍMULO

Experimento A: a fin de determinar si la sobrecarga de MP sobre MA altera su capacidad de defensa (i.e. infección bacteriana) los MA se incubaron en presencia de CFA durante 24 horas al cabo de las cuales se determinó la generación de ROS utilizando TPA como activador de MA. Los resultados muestran una disminución significativa en la capacidad de generar ROS.

Experimento B: al incubar los MA con CFA durante 24 horas y luego agregando medio fresco otras 24 horas, se observó una recuperación en la capacidad de generación de ROS de los MA. Esta última es menor en condiciones de sobrecarga con fracciones F (Figura 2.8).

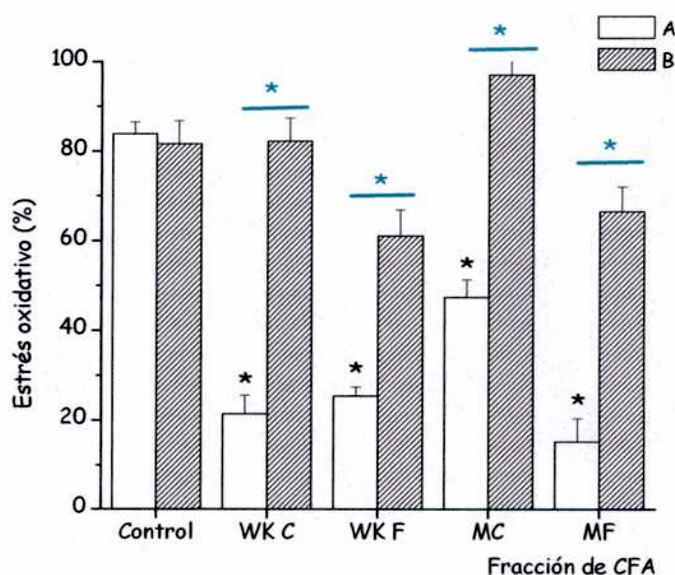


Figura 2.8:

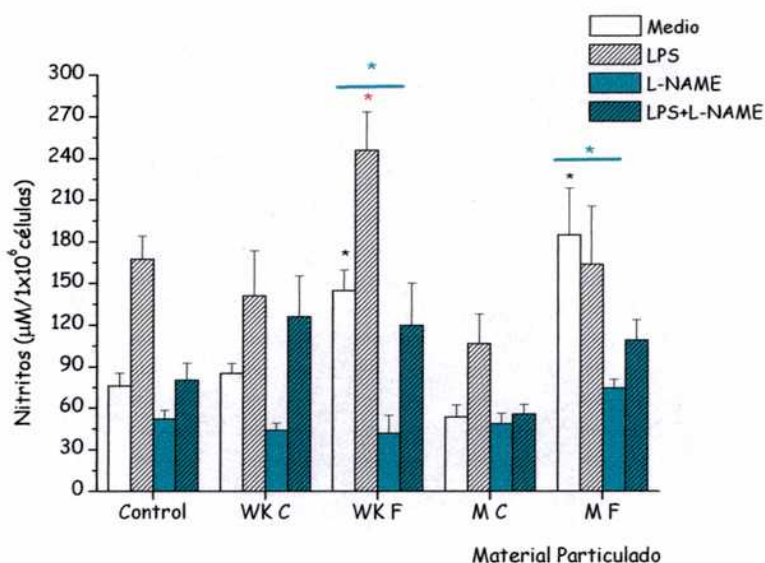
Generación de ROS. A: luego de 24 horas de exposición a CFA (250 $\mu\text{g/ml}$). B: idem incubando durante otras 24 horas en presencia de medio fresco. Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0,05$): *con respecto al control sin partículas, *con respecto al tratado con la misma clase de CFA en A

E-GENERACIÓN DE NITRITOS.

Sólo las fracciones F indujeron aumentos significativos en la generación de nitritos (medida indirecta del óxido nítrico generado). La incubación con partículas C no generó diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 2.9). La concentración de nitritos en el medio de cultivo de MA incubados en presencia de CFA y LPS permanece cercana a los valores del control sin CFA, con excepción de los incubados con WK F y LPS.

La concentración de nitritos disminuye cuando los MA son incubados MF y WK F en presencia de L-NAME

Figura 2.9: generación de nitritos: cultivos de MA se incubaron durante 24 horas en presencia de CFA (250 $\mu\text{g/ml}$) y en presencia o ausencia de LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y L-NAME (1 mM). Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0,05$):
 *respecto del control sin MP
 *respecto del control con LPS
 *entre CFA y CFA + L-NAME



LAS FRACCIONES F Y C NO AFECTAN LA VIABILIDAD DE MA IN VITRO E INDUCEN LA GENERACION DE ROS Y DE TNF- α . SIN EMBARGO LA EXPOSICIÓN A FRACCIONES F GENERA AUMENTOS EN LA LIBERACIÓN DE NITRITOS Y LA FACOCITOSIS DE LAS MISMAS CONDUCE A LA ALTERACIÓN EN ALGUNAS FUNCIONES DE DEFENSA

2-EFECTOS BIOLÓGICOS DE MP OBTENIDO A PARTIR DE LA COMBUSTIÓN DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO

2.1-EFECTOS *IN VIVO*

PARTÍCULAS DE COQUE Y PARTÍCULAS DE ORIGEN URBANO

El éxito de la instilación intratraqueal se corroboró histológicamente. La Figura 2.8 muestra las trazas de MP depositadas en zonas de las vías aéreas inferiores del ratón.

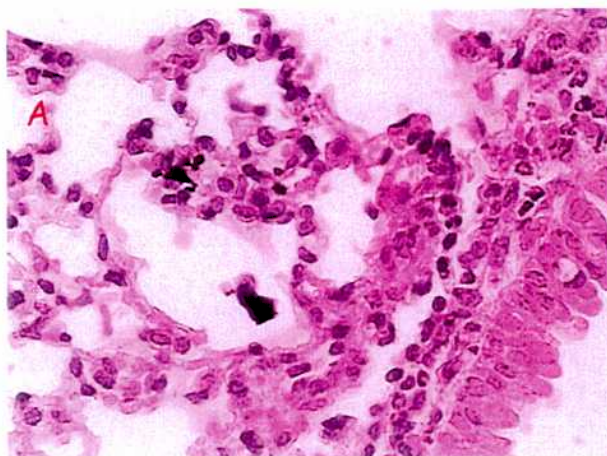
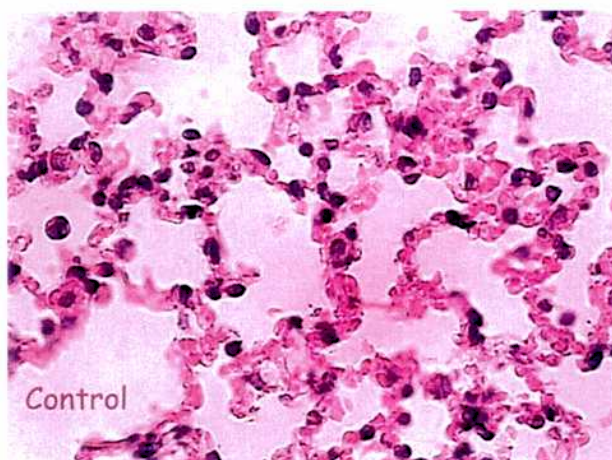


Figura 2.10:

A: corte histológico de pulmón de ratón 18 horas luego de la instilación con solución salina (300x)

B: idem, instilado con muestra A (200x)

Las muestras ambientales A y B se recolectaron en el piso de viviendas de zonas aledañas a una coquería industrial. La muestra A consiste fundamentalmente en coque calcinado, mientras que la muestra B contiene una proporción 60 % crudo-40% calcinado (ver página 71)

Por otro lado, la muestra $PM_{2.5}$ CAC fue recolectada en una zona con alto tránsito vehicular. Debido a las condiciones de muestreo esta muestra presenta MP con un $d_{ae} < 2.5 \mu m$.

A-ANÁLISIS DE INDICADORES INFLAMATORIOS

Dado que el material A presenta un alto contenido de sílice debido a la presencia de partículas del suelo, se realizó un control sólo con partículas del suelo (grupo sA) para determinar si los efectos producidos por A se deben, en parte, al sílice presente en el suelo.

RECUESTO DIFERENCIAL DE CÉLULAS.

La instilación de las muestras A, B y $PM_{2.5}$ CAC produjo un aumento significativo ($p < 0,001$) en el número total de células en el BAL (Tabla II.7).

Los aumentos en el número total de células presentes en BAL luego de la IT de las muestras A y B se deben al aumento significativo en el número total de PMN (Tabla II.7). En el grupo instilado con $PM_{2.5}$ (CAC) no se observó un aumento significativo en el número total de PMN. Por otro lado, para los grupos instilados con A, B y $PM_{2.5}$ (CAC) los porcentajes de PMN resultaron significativamente ($p < 0,01$) elevados comparados con los valores del grupo control (Figura 2.11). Los valores de porcentajes de PMN en BAL son significativamente mas elevados en A que en B ($p < 0,05$). El grupo instilado sólo con sA no presentó cambios significativos en estos parámetros.

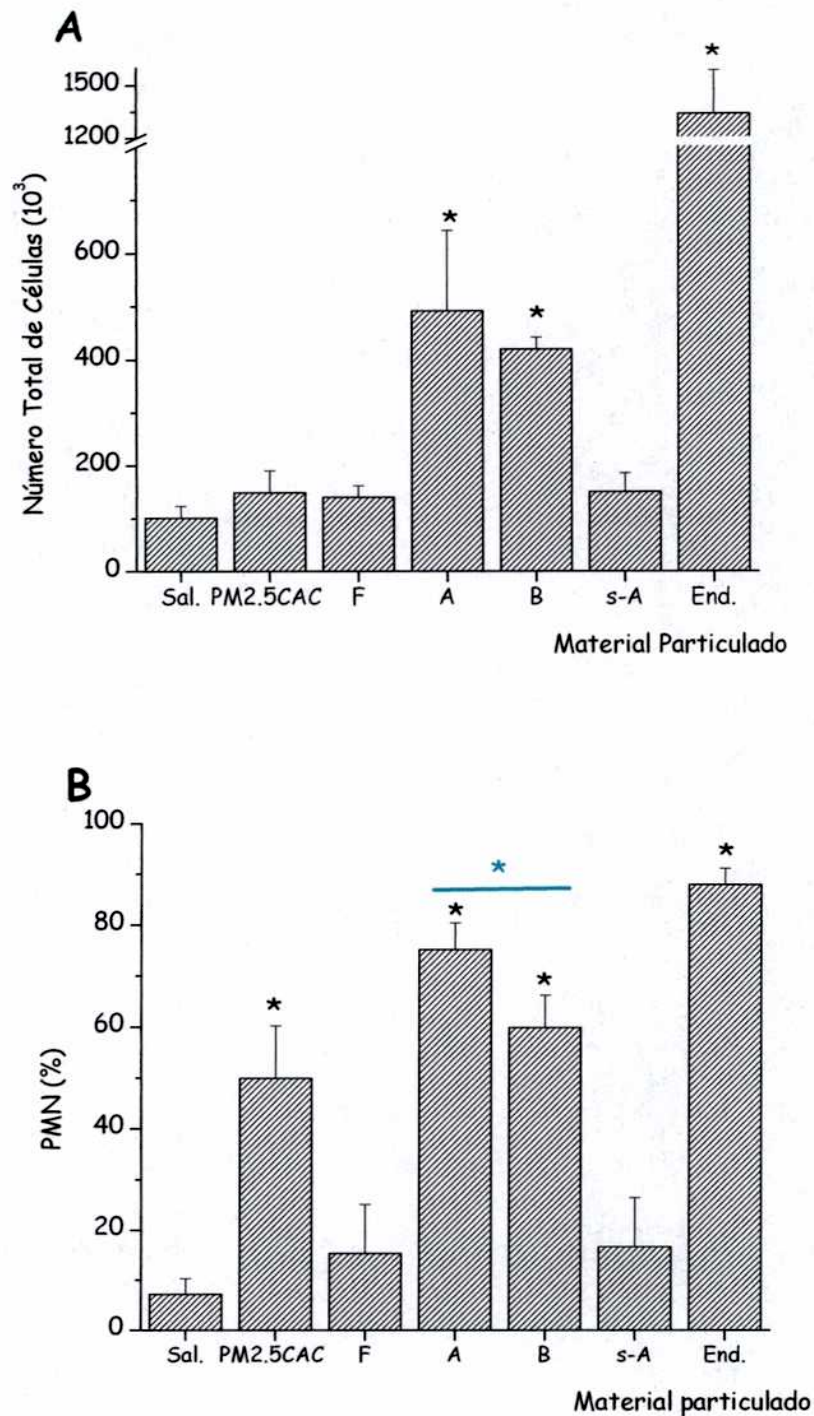


Figura 2.11: A: número total de células (número de células $\times 10^3$ / BALF) y B: Porcentaje de PMN en el BALF 18 horas luego de la IT de MP (5mg/Kg). Indica diferencias significativas:

*respecto del grupo control ($p < 0,01$)

*entre ambos tipos de muestras de coque ($p < 0,05$):

Si bien el tamaño de las partículas presentes en las muestras A y B es mayor que el de CFA ($4\text{-}40\ \mu\text{m}$ vs $< 2,5\mu\text{m}$ respectivamente), los macrófagos alveolares en el BAL de ratones instilados con A y B, presentan una importante cantidad de partículas fagocitadas (Figura 2.12). Esto indica que existe una proporción importante de partículas de tamaño respirable ($<2,5\mu\text{m}$) en las muestras A y B.

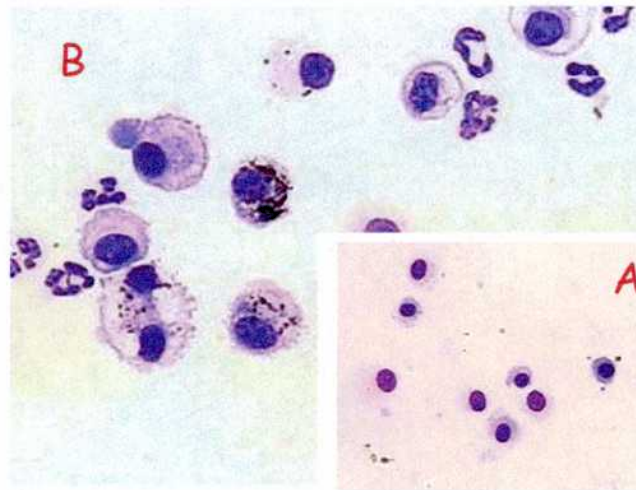


Figura 2.12: A: poblaciones celulares en BAL de animales instilados con solución salina (100x) B: idem instilados con la muestra A (400x)

Células MP	NÚMERO TOTAL	EOSINÓFILOS	
		PMN	MA
SALINA	100,7 ± 22,2	7,9 ± 3,7	91,6 ± 24,3
ENDOTOX	1331,6 ± 247,3*	1180,3 ± 24,4*	146,1 ± 34,1
PM _{2,5} CAC	148,4 ± 41,0	50,9 ± 18,3*	82,8 ± 38,5
FILTRO	139,6 ± 22,2	27,3 ± 25,6	111,8 ± 22,4
A	490,5 ± 151,3*	378,9 ± 85,5*	104,8 ± 39,9
B	418,6 ± 22,5*	249,5 ± 27,7*	166,7 ± 28,6
SA	150,6 ± 35,7	20,9 ± 11,1	129,3 ± 42,5
			0

Tabla II.7: valores absolutos de células (número de células x 10³/BAL) 18 horas luego de la IT de MP (5 mg/Kg). Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 µg/ratón) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los valores están expresados como la media ± SE (n=5)
Diferencias significativas: *respecto del grupo control (p<0,001), *entre muestras A y B (p<0,05)

INDICADORES BIOQUIMICOS

La Tabla II.8 muestra los datos de los parámetros bioquímicos estudiados:

A-El contenido de proteínas totales no presentó aumentos significativos con respecto al control.

B-La actividad LDH resultó significativamente elevada en los grupos instilados con A y B ($p < 0,05$).

C-La actividad NAG resultó significativamente elevada en el grupo instilado con A y B ($p < 0,005$ y $0,05$ respectivamente) comparada con el grupo control. Los valores hallados para el grupo B son significativamente elevados comparados con el grupo A ($p < 0,05$)

D-La concentración de albúmina no presentó aumentos significativos con respecto al control.

Los parámetros bioquímicos analizados en los grupos instilados con material proveniente del filtro (F) y SA no difieren del control.

ENSAYO	ALBÚMINA ($\mu\text{g/ml}$)	PROTEÍNAS TOTALES (mg/ml)	LDH (U/l)	NAG (U/l)
MP				
SALINA	23,0 $\pm 6,26$	253,0 $\pm 53,6$	42,0 $\pm 9,0$	1,1 $\pm 0,1$
PM _{2,5} CAC	18,2 $\pm 2,0$	187,7 $\pm 16,5$	62,2 $\pm 10,2$	1,3 $\pm 0,1$
F	21,7 $\pm 2,3$	237,7 $\pm 25,1$	69,2 $\pm 13,4$	2,3 $\pm 0,4$
A	24,0 $\pm 2,5$	246,6 $\pm 21,0$	77,0 $\pm 8,38^*$	2,5 $\pm 0,2^*$
B	26,0 $\pm 0,7$	267,6 $\pm 48,0$	74,0 $\pm 9,0^*$	3,1 $\pm 0,2^*$
sA	ND	273,0 $\pm 33,2$	44,6 $\pm 7,5$	ND
END.	36,2 $\pm 2,5$	526,2 $\pm 6,0^*$	168,0 $\pm 33,2^*$	7,4 $\pm 0,7^*$

Tabla II.8: indicadores bioquímicos en BAL 18 horas luego de la IT de MP (5 mg/Kg). Los grupos instilados con solución salina y endotoxina (10 $\mu\text{g/ratón}$) se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente. Los valores están expresados como la media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas: * con respecto al grupo control ($p<0,05$) y * entre muestras Ay B ($p<0,05$)

TNF- α

Los valores de TNF- α medidos en BAL resultaron significativamente elevados para las dos muestras de coque analizadas: $45,0 \pm 15,0$ y $30,0 \pm 10,0$ y $22,2 \pm 6,3$ U/ml para las muestras A y B y SA respectivamente con respecto al grupo instilado con solución salina ($8,0 \pm 0,5$ U/ml). Los grupos instilados con PM_{2.5} CAC y con F no presentaron cambios con respecto al control.

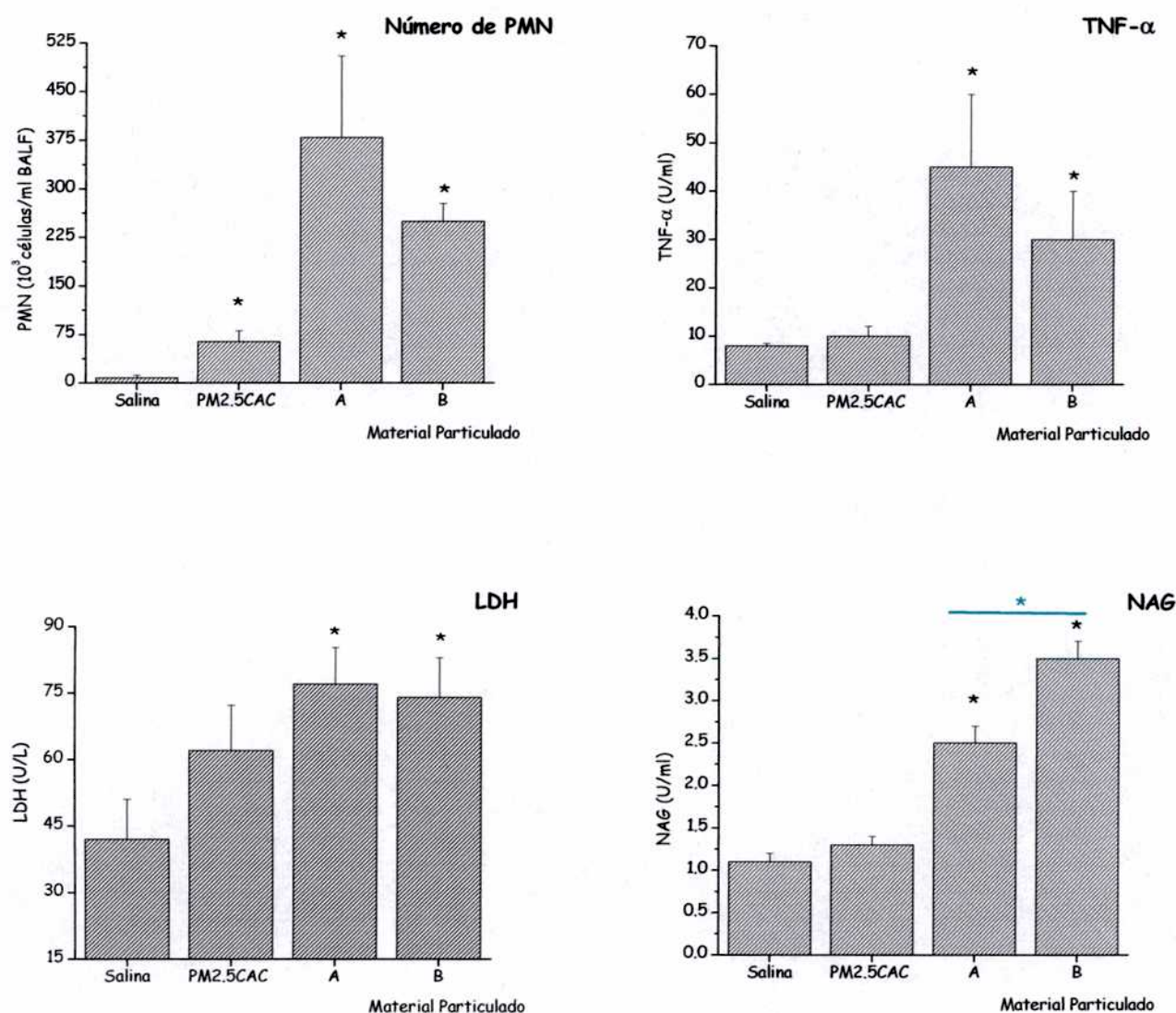


Figura 2.13: resumen de los indicadores de inflamación pulmonar 18 horas luego de la IT de 5 mg/Kg de MP. Los valores están expresados como la media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas (p<0,05): * respecto del control, * entre ambos tipos de muestras de coque

LOS GRUPOS INSTILADOS CON LAS MUESTRAS DE COQUE A Y B PRESENTAN INDICADORES INFLAMATORIOS ELEVADOS CON RESPECTO AL GRUPO INSTILADO CON LA MUESTRA URBANA Y AL GRUPO INSTILADO CON SOLUCIÓN SALINA (Figura 2.13).

B-EFECTOS DEL ANTIOXIDANTE DMTU

El MP con un alto contenido de compuestos orgánicos adsorbidos ejerce efectos biológicos atribuidos a las ROS.²³⁸ Entre esta clase de partículas las mas importantes son las *Diesel Exhaust Particles* (DEP). Dado que el coque presenta similitudes fisico-químicas con ellas, se especula que podría producir alteraciones en las vías aéreas a través de mecanismos similares a las DEP, en los que las ROS juegan un rol importante. Se utilizó el antioxidante DMTU para confirmar indirectamente clarificar este concepto.

ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES

La administración sistémica del antioxidante DMTU condujo a una disminución significativa ($p < 0,01$) en el número total de células y en el número de PMN ($p < 0,01$) en el BAL del grupo instilado con B (Tabla II.9). Los porcentajes de PMN también disminuyen significativamente en este grupo. No se observaron efectos ni en los animales instilados con la muestra A ni en los instilados con la muestra urbana (Figura 2.14).

CÉLULAS Tratam. MP	CÉLULAS TOTALES (1×10^3)		PMN (1×10^3)	
	Salina	DMTU	Salina	DMTU
Salina	100,7 ± 22,5	98,5 ± 15,3	7,9 ± 3,7	20,8 ± 16,4
Endotox,	1331,7 ± 247,3*	829,3 ± 91,7*	1180,3 ± 44,8*	680,2 ± 81,6*
PM _{2,5} (CAC)	148,4 ± 41,0	105,4 ± 15,4	50,9 ± 18,3	44,1 ± 11,7
F	139,6 ± 22,2	116,4 ± 38,1	27,4 ± 15,6	1,1 ± 0,7
A	490,5 ± 151,3*	491,1 ± 12,9	378,9 ± 85,5*	354,0 ± 105,1
B	418,6 ± 22,5*	163,7 ± 27,3*	249,5 ± 27,7*	66,3 ± 19,8*

Tabla II.9: efecto del antioxidante DMTU (500 mg/Kg) sobre indicadores bioquímicos en BAL 18 horas luego de la IT del MP (5 mg/Kg)). Los valores se expresan como media ± ES (n=5). Diferencias significativas: *respecto del grupo control (p<0,001), * entre tratamiento con DMTU y el control (p>0,05)

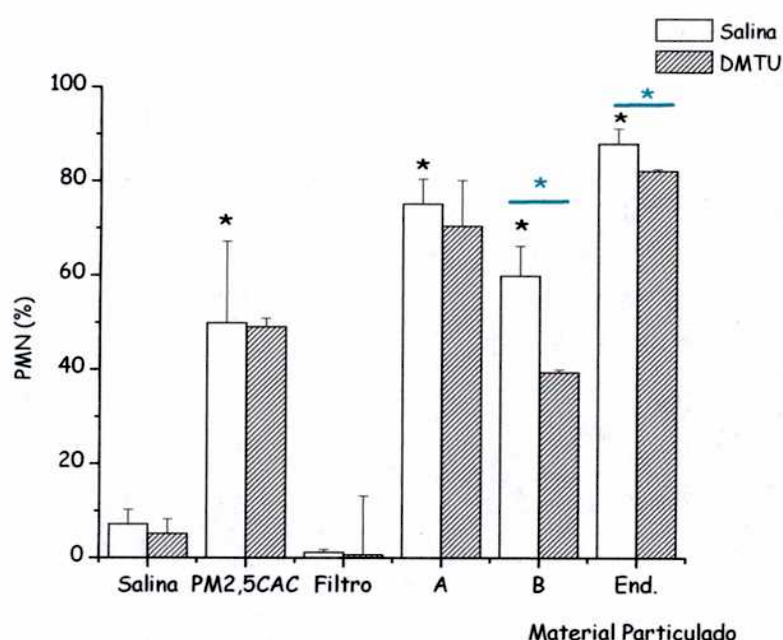


Figura 2.14: porcentajes de PMN... 18 horas luego de la IT de MP (5 mg/Kg), previo tratamiento con DMTU (500 mg/Kg) ó solución salina. Los valores se expresan como media ± SE (n=5). Diferencias significativas: *respecto del grupo control (p<0,001) *respecto del correspondiente sin DMTU (p<0,05)

INDICADORES BIOQUÍMICOS

La Tabla II.10 indica que el pre-tratamiento con DMTU disminuye significativamente la actividad NAG en el grupo B. No obstante el resto de los parámetros permanecen elevados. Este antioxidante no ejerce ningún efecto en los grupos tratados con PM_{2.5} CAC y A.

EL PRE-TRATAMIENTO CON DMTU DISMINUYE EL FLUJO DE PMN Y LA ACTIVIDAD NAG EN EL GRUPO INSTILADO CON B.

ENSAYO	ALBÚMINA ($\mu\text{g/ml}$)		PROTEÍNAS TOTALES (mg/ml)		LDH (U/l)		NAG (U/l)	
	SALINA	DMTU	SALINA	DMTU	SALINA	DMTU	SALINA	DMTU
TRAT, MP								
SALINA	23,0 $\pm 6,26$	20,8 $\pm 4,7$	253,0 $\pm 53,6$	247,6 $\pm 50,7$	42,0 $\pm 9,0$	77,2 $\pm 27,5$	1,2 $\pm 0,03$	1,1 $\pm 0,07$
PM _{2,5} (CAC)	18,2 $\pm 2,0$	23,4 $\pm 2,4$	187,7 $\pm 16,5$	207,4 $\pm 20,5$	62,2 $\pm 17,2$	97,0 $\pm 10,4$	1,3 $\pm 0,1$	1,5 $\pm 0,8$
FILTRO	21,7 $\pm 2,3$	27,2 $\pm 4,1$	237,7 $\pm 25,1$	227,8 $\pm 33,4$	69,2 $\pm 13,4$	67,6 $\pm 19,3$	2,3 $\pm 0,4$	2,0 $\pm 0,3$
A	24,0 $\pm 2,5$	24,6 $\pm 3,3$	246,6 $\pm 21,0$	289,6 $\pm 53,5$	77,0* $\pm 8,3$	98,2 $\pm 20,4$	2,5 $\pm 0,2^*$	3,0 $\pm 0,8$
B	26,0 $\pm 0,7$	19,0 $\pm 0,5^*$	267,6 $\pm 48,0$	217,8 $\pm 7,6^*$	74,0 $\pm 9,0^*$	73,8 $\pm 19,8$	3,1 $\pm 0,2^*$	1,2 $\pm 0,2^*$
ENDOTOX	36,2 $\pm 2,5^*$	35,8 $\pm 3,1$	526,2 $\pm 76,0^*$	435,0 $\pm 48,3$	168,0 $\pm 33,2^*$	114,4 $\pm 10,8^*$	7,4 $\pm 0,7^*$	6,07 $\pm 1,0$

Tabla II.10: efecto del antioxidante DMTU sobre los indicadores bioquímicos en BAL 18 horas luego de la IT de la MP. Los valores están expresados como la media $\pm$ SE (n=5). Diferencias significativas: *respecto de controles instilados con solución salina y * respecto de los controles inyectados previamente con salina ($p < 0,01$).

C-FAGOCITOSIS DE MP POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES *IN VIVO*

El área de los macrófagos se puede considerar como una expresión válida del volumen de los mismos.¹⁷⁵ La medida del área de los macrófagos presentó poca variabilidad ($140,1 \pm 13,8 \mu\text{m}^2$). En base a esto, se determinaron dos parámetros: el **Índice Fagocítico** (porcentaje de células que incorporan MP) y la **Capacidad Fagocítica** (área celular ocupada por MP).

Se observaron valores crecientes de estos índices en los grupos instilados con las muestras B, A y $\text{PM}_{2.5}\text{CAC}$ respectivamente (Figura 2.15 - A y B). También se observa que el grupo instilado con B presenta un nivel significativamente mayor de macrófagos en BAL con respecto a los otros grupos, pero que cada macrófago fagocita una menor cantidad de MP.

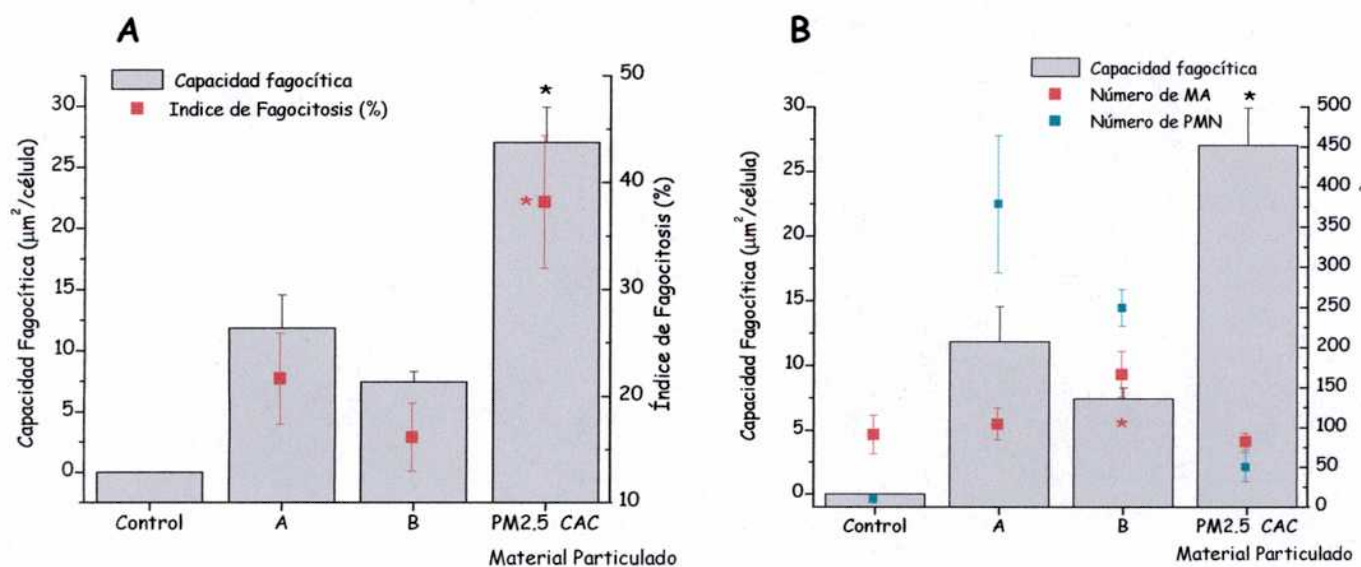


Figura 2.15: A- Índice de Fagocitosis y Capacidad Fagocítica. B-Número de MA y de PMN (10^3 células/BAL) y Capacidad Fagocítica. Los valores se expresaron como la media $\pm$ SE (n=5). Estos valores se obtuvieron mediante análisis de imágenes de MA obtenidos en el BAL de animales instilados con MP (5 mg/Kg) realizado 18 horas luego de la IT.

Diferencias significativas: * respecto del grupo control y * entre las distintas clases de MP ($p < 0,05$).

LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA ES MAYOR PARA LAS POBLACIONES DE MA QUE FAGOCITARON LAS MUESTRAS A y $\text{PM}_{2.5}\text{CAC}$.

1.2-EFECTOS *IN VITRO*

A-VIABILIDAD

Los valores de viabilidad celular, luego de 24 horas de exposición a las muestras A, B, y PM_{2.5}CAC (62,5-250 µg/ml), obtenidos mediante el ensayo de captación de Rojo Neutro y actividad LDH, se mantienen dentro de valores similares al control.

B-ACTIVIDAD NAG

La actividad NAG, de MA expuestos durante 24 horas a las muestras ambientales A y B (250 µg/ml), resultó significativamente ($p < 0,05$) elevada ($1,9 \pm 0,3$ y $2,1 \pm 0,2$ respectivamente) con respecto al control ($1,1 \pm 0,1$). No se detectaron diferencias significativas con respecto al control a tiempos cortos de incubación (4 horas). La muestra urbana PM_{2.5} CAC y no indujo aumentos en actividad NAG.

C-CITOQUINAS

Para el estudio de la liberación de TNF- α , se realizó una curva dosis-respuesta empleando un rango de concentraciones de 50-250 µg/ml de MP. La Figura 2.16 indica que las dos muestras ambientales A y B (250 µg/ml) son capaces de estimular la liberación de esta citoquina mientras que la muestra PM_{2.5}CAC no estimuló la liberación de TNF- α .

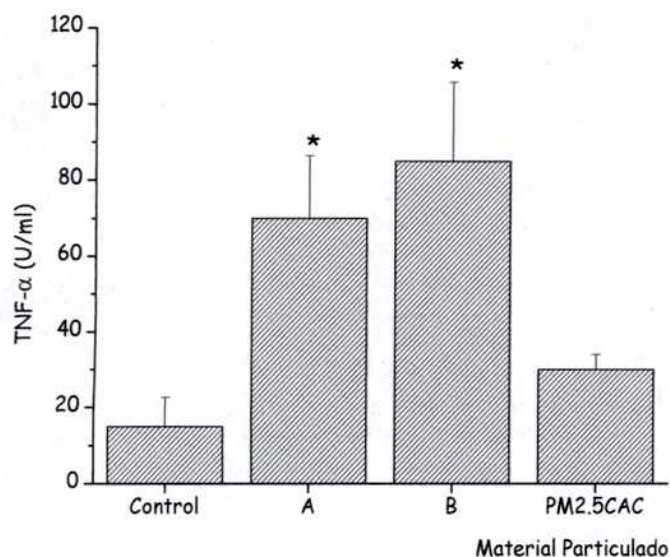


Figura 2.16: niveles de TNF- α en el medio de cultivo. MA se incubaron a 37°C durante 24 horas en presencia de MP (250 μ g/ml. Los valores se expresaron como la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0,05$): *con respecto al control.

D-ESTRÉS OXIDATIVO

GENERACIÓN DE ROS POR MP PROVENIENTE DE DERIVADOS DEL PETRÓLEO

En la Figura 2.17 se observa que sólo la muestra B promueve significativamente ($p < 0,05$) la generación de ROS en cultivos de MA y que el tratamiento con DMTU revierte parcialmente estos efectos. Las muestras A y PM_{2.5}CAC no estimulan la generación de ROS en MA.

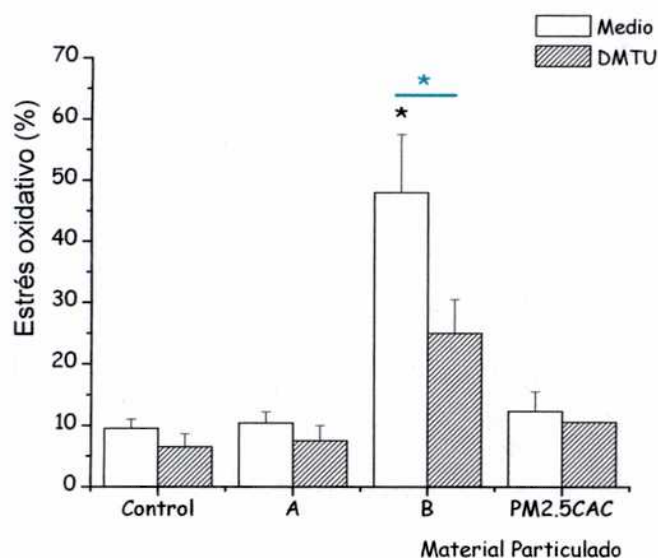


Figura 2.17: cultivos de MA incubados durante 1 hora en presencia de MP (250 μ g/ml) o solución salina.

Idem y preincubando con DMTU (10mM) o solución salina durante 1 hora.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). Diferencias significativas ($p < 0.05$):

*respecto del control

*respecto del correspondiente sin DMTU

RESPUESTA AL ESTÍMULO

Experimento A: bajo condiciones de sobrecarga celular con muestras ambientales de coque se observa disminución significativa ($p < 0,05$) en la capacidad de MA de generar ROS bajo estimulación con TPA. La muestra urbana ($PM_{2.5}CAC$) no genera cambios con respecto al control.

Experimento B: los efectos observados previamente se revierten al incubar los MA por otro período de 24 horas indicando la capacidad de recuperación parcial de los MA (Figura 2.18).

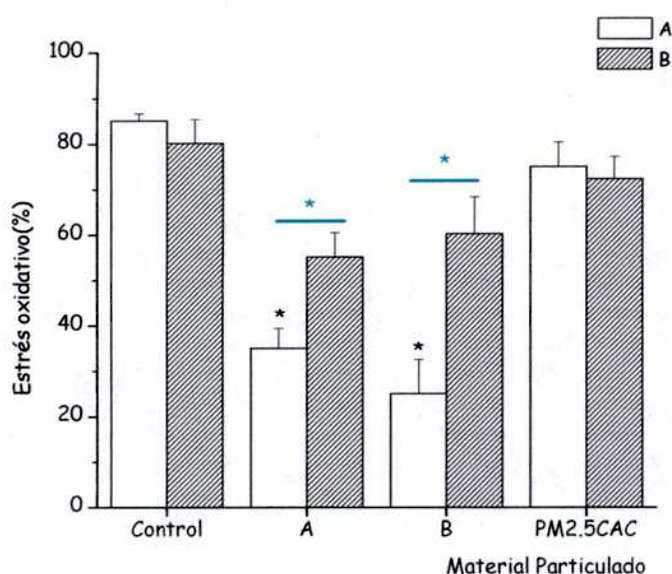


Figura 2.18: generación de ROS.

A: luego de 24 horas de exposición a MP (250 $\mu\text{g/ml}$).

B: idem incubando durante otras 24 horas en presencia de medio fresco. Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5).

Diferencias significativas ($p < 0,05$):

*con respecto al control

*con respecto al tratado con la misma clase de MP en A

C- GENERACIÓN DE NITRITOS

La Figura 2.19 indica que las partículas A, B y $PM_{2.5}CAC$, aumentan los valores de nitritos en el medio de cultivo celular. Sólo en aquellas incubadas con $PM_{2.5}CAC$, en presencia de L-NAME los valores de nitritos se mantienen dentro de los niveles basales.

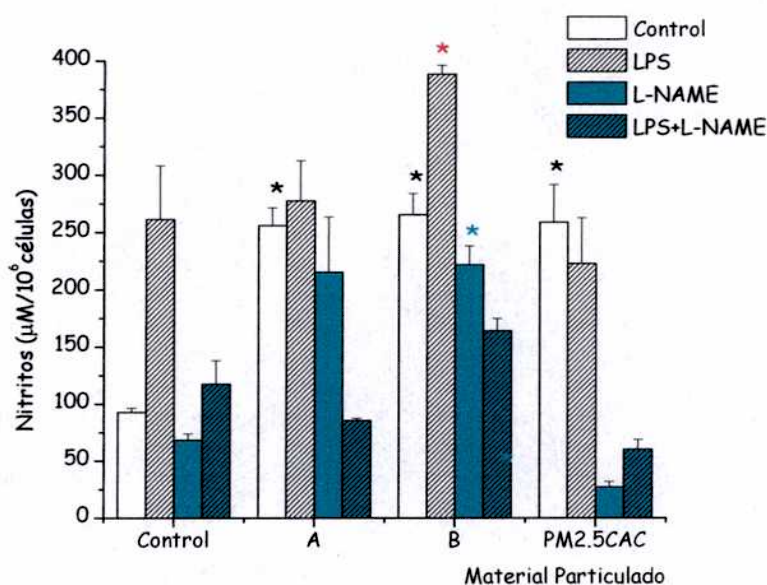


Figura 2.19: generación de nitritos. Cultivos de MA se incubaron durante 24 horas en presencia de MP (250 µg/ml) y en presencia de LPS (1 µg/ml) y/o L-NAME (1 mM) o solución salina. Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5). diferencias significativas ($p < 0,05$): * respecto del control sin MP, * respecto del control con LPS, * entre MP y MP + L-NAME.

LAS MUESTRAS DE COQUE A Y B ACTIVAN MA MEDIANTE AUMENTOS EN LA ACTIVIDAD NAG, INDUCCIÓN EN LA LIBERACIÓN DE TNF- α Y LIBERACIÓN DE NITRITOS.

LA MUESTRA B (ENRIQUECIDA EN COQUE CRUDO) ES CAPAZ DE GENERAR LA LIBERACIÓN DE ROS, HECHO QUE SE REVIERTE EN PRESENCIA DE DMTU.

LA MUESTRA URBANA GENERA EFECTOS MENORES CON RESPECTO A LAS ANTERIORES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, a partir de estudios epidemiológicos, se ha encontrado una correlación entre el aumento en los niveles de enfermedades respiratorias y cardio-pulmonares humanas y la creciente contaminación atmosférica con material particulado (MP). Esta problemática tiene importantes repercusiones tanto a nivel económico como de salud pública.^{1,13}

El aire que respiramos contiene contaminantes que son básicamente una mezcla de gases y de material particulado y es la combinación de ambos lo que genera los efectos biológicos adversos. Para iniciar esta línea de investigación, se comenzó con el estudio de la acción de material particulado analizando los componentes del mismo como posibles causantes de efectos biológicos adversos en animales experimentales.

El MP de origen antropogénico analizado en este trabajo está vinculado a la generación de energía (combustión del carbón), a emisiones industriales (calcinación del coque) etc, todas ellas vinculadas a actividades del hombre necesarias para el desarrollo de la vida cotidiana.

Con respecto a los datos obtenidos con partículas provenientes de la combustión del carbón (CFA) se puede considerar lo siguiente:

La generación de energía eléctrica en países como USA y China¹⁷⁶ se realiza principalmente mediante la combustión completa del carbón en las centrales térmicas debido a que éste se encuentra en grandes cantidades y en yacimientos de fácil acceso. Si bien en estos países se dispone de tecnologías eficientes y dispositivos adecuados que facilitan el control de la contaminación ambiental, las cenizas de la combustión del carbón (CFA) constituyen una importante fuente de MP contaminante. En el caso particular de USA existen diferencias importantes entre el carbón proveniente del oeste y el proveniente del este del país. Dada la posibilidad de obtener el material fraccionado según su tamaño, se realizaron experimentos en animales a fin de determinar algunos efectos biológicos.

Los estudios de toxicología tradicional han utilizado principalmente altas dosis de CFA no fraccionado¹⁷⁷ y describen ampliamente cuadros de inflamación pulmonar y mayor susceptibilidad a infecciones.¹⁷⁸ En el presente estudio se han empleado dosis menores (5 y 1.25 mg/Kg) de CFA y éste ha sido fraccionado según el tamaño de las partículas que lo componen: C, F y UF a fin de evaluar los efectos de cada fracción por separado.

El CFA, como la mayoría del MP proveniente de combustiones antropogénicas, presenta una porción significativa de partículas *ultrafine* (UF) las cuales, por su pequeño tamaño, escapan a los dispositivos de control. Hay un gran interés en el estudio de estas partículas debido a que, aunque representan una pequeña fracción en masa total, la contribución en número a la cantidad total de MP es notoria.

El CFA proveniente de la combustión del carbón de Montana (subituminoso-Oeste) contiene una fracción UF que consiste básicamente en sulfato de calcio con abundante contenido en trazas de metales, mientras que las fracciones MF y MC consisten en aluminosilicatos con un elevado contenido de cuarzo. El Ca reacciona con compuestos ácidos para formar sulfatos de calcio muy estables. La fracción UF presenta un enriquecimiento en trazas de metales debido a la vaporización de elementos volátiles y a su posterior nucleación. Las características del proceso de combustión conducen a cambios en la especiación elemental, lo cual afecta la solubilidad y la bio-disponibilidad de los metales. El grado de enriquecimiento de los elementos en la fracción de menor tamaño varía según el tipo de carbón y se debe, en parte, a diferencias en la distribución de material mineral en el carbón que le dio origen.¹⁶⁶ Las fracciones F y C están constituidas por aluminosilicatos, con un elevado contenido de cuarzo. Esta composición se repite en las fracciones provenientes de la combustión del carbón de WK (bituminoso). Ambas presentan, además, una importante cantidad de hierro: WKF presenta hierro metálico en grandes cantidades, mientras que WKC presenta óxidos de hierro. Estos resultados

están en concordancia con trabajos realizados en CFA provenientes de otros tipos de carbón.¹⁷⁹ En estas publicaciones se describe que las fracciones F y C están compuestas principalmente por aluminosilicatos y por metales poco solubles. El aluminio y el silicio no se vaporizan durante la combustión y atrapan grandes cantidades de otros elementos.¹⁸⁰

Con respecto a la acción biológica del CFA, la fracción UF de Montana generó un aumento significativo en el número de células en el BAL, incluso a la dosis más baja, que se ha atribuido al aumento en el número de PMN. Éste último es un indicador importante de un proceso inflamatorio.¹⁸¹ La instilación con MUF generó aumentos en la actividad NAG indicando una activación en los macrófagos probablemente causada por el contacto y/o la fagocitosis de este MP. Los niveles de TNF- α e IL-6 en el BAL resultaron significativamente elevados. Los datos de la literatura atribuyen el aumento de estos mediadores a la acción de ROS⁹⁹ generado por el contacto y/o fagocitosis del MP. Este incremento en los niveles de TNF- α estaría relacionado con aumentos en los niveles de IL-6.¹⁸² Estos, a su vez, inducirían aumentos en el número de PMN en sangre.¹⁸³ Los elevados niveles de MIP-2 estarían relacionados con el incremento observado en el número de PMN en el BAL de animales instilados con MUF. Al respecto existen referencias bibliográficas que reportan altos niveles de TNF- α en células epiteliales pulmonares que inducirían la liberación de IL-8¹⁸⁴ (efectos análogos a MIP-2 pero en humanos) y que esta respuesta es amplificada por la presencia de PMN.¹⁸⁵

Una hipótesis de peso atribuye los efectos biológicos de las partículas UF a la gran superficie de contacto que presentan⁹⁹. Esta gran superficie en área favorece la generación de ROS, incluso en ausencia de metales.¹⁰⁰ Se utilizó la administración sistémica del antioxidante DMTU en ratones instilados con MUF a fin de determinar la participación de las ROS en este proceso. Este antioxidante ha favorecido la disminución de los niveles de algunos indicadores inflamatorios en animales instilados con MUF aunque éstos no resultaron

significativos. Otros trabajos que emplearon ROFA¹⁸⁶, otros tipos de CFA²⁰² y MP urbano.¹⁰⁵ indican que el pre-tratamiento con el antioxidante DMTU inhibe la inflamación pulmonar inducida por instilación intra-traqueal. El hecho de que los efectos de MUF no se controlan eficazmente con el empleo de antioxidantes indica que los mismos no estarían relacionados sólo con la generación de ROS sino que otros factores, como por ejemplo su alto contenido de azufre, podrían ser determinantes en su acción deletérea. Se ha reportado que la exposición aguda o crónica a partículas carbonosas cubiertas de azufre produce alteraciones en los mecanismos de defensa pulmonares^{187,188} mediante la disminución de la fagocitosis y la destrucción intracelular de bacterias patógenas así como por la disminución en la producción de importantes mediadores biológicos críticos para el mantenimiento de la inmuno-competencia pulmonar.¹⁸⁹

Hay que tener en cuenta que el número de partículas para una determinada masa es mayor para partículas de menor tamaño, por lo tanto, los efectos observados pueden deberse a que un número mayor de partículas sea fagocitado por cada célula o a que un número mayor de células se vea afectado.¹⁹⁰ Desafortunadamente la fracción WKUF no estuvo disponible para una completa comparación de los dos tipos de carbón.

La fracción MF generó aumentos en los parámetros inflamatorios analizados pero, a diferencia de MUF, sólo cuando se instiló la mayor concentración de partículas: se detectaron aumentos en la proporción de PMN en BAL, acompañada por un aumento en los niveles de albúmina, proteínas, NAG y MIP-2. Las alteraciones en el micro-ambiente alveolar (niveles elevados de proteínas y de albúmina) indican pérdida de la integridad en la barrera epitelial. Sin embargo la actividad LDH no está incrementada, por lo tanto esta extravasación de proteínas no se debería a ruptura celular sino que podría estar mediada por contracción endotelial o por reorganización del cito-esqueleto.⁵⁸ La administración de DMTU en el grupo instilado con MF no mejora

los parámetros inflamatorios. La inflamación generada por MF, podría deberse al importante contenido de cuarzo en esta fracción. Está descrito que la inhalación de partículas de cuarzo genera respuestas inflamatorias pulmonares^{191,192,193,194, 195} y que la inducción de MIP-2 por sílice en células epiteliales esta mediado por TNF- α inducido por ROS.¹⁹⁶

Se ha hecho referencia a la correlación entre el tamaño de la partícula y sus efectos sobre el sistema respiratorio. Las partículas UF y F alcanzan las regiones alveolares y se acumulan en ellas, induciendo los efectos previamente descritos, mientras que la fracción C no llega a depositarse en los alvéolos. Por este motivo las partículas de este tamaño no afectan los parámetros aquí analizados.

Con respecto a los efectos del CFA obtenidos a partir de la combustión de carbón proveniente de W Kentucky (bituminoso-este), se observó que la fracción WKF produce efectos inflamatorios similares a los producidos por MF pero de mayor intensidad. Esto coincide con estudios realizados por otros grupos que indican que la inhalación de partículas generadas por la combustión de carbón bituminoso con alto contenido de azufre produce mayor toxicidad que la inhalación de partículas generadas a partir de carbonos sub-bituminosos y lignitos.¹⁹⁷

El CFA proveniente de WK contiene un elevado contenido de Fe asociado a aluminosilicatos. La administración sistémica del antioxidante DMTU ha disminuido los índices inflamatorios en el grupo instilado con WKF. Esto podría deberse, en parte, al alto contenido de Fe presente en esta fracción, el cual participaría en la generación de ROS mediante la reacción de Haber-Weiss.¹⁵¹

La bio-disponibilidad del hierro varía según el tamaño de la partícula y el tipo de carbón utilizado para generar el CFA. El hierro es movilizado en mayor cantidad en las fracciones F que en las C.¹⁹⁸ Las primeras se caracterizan por presentar una mayor tasa de movilización del mismo, la cual depende de su especiación.^{199,200} Este CFA alcanza las zonas alveolares donde las partículas

son fagocitadas con la consecuente movilización del hierro²⁰¹, éste es almacenado intracelularmente y participa en la inducción de IL-8, evento dependiente de ROS.²⁰²

La fracción WKF presenta también un contenido importante de zinc. Este elemento ha sido descrito como factor destacado en el desarrollo de inflamación pulmonar^{203,204,205,206} y en la depresión de la actividad fagocítica de MA.²⁰⁷

En lo que respecta a la instilación con la fracción KC, al igual que con MC, no se producen aumentos en los valores de los parámetros de inflamación analizados.

El coque de petróleo, utilizado en la industria del aluminio, es de especial interés en cuanto a su acción sobre la salud humana debido a que presenta un alto contenido de compuestos que han sido clasificados como carcinógenos mutagénicos (PAH).^{1304,131} Las exposiciones prolongadas a estas partículas deben ser evitadas debido a los efectos deletéreos de estos compuestos. Si bien los trabajadores de los hornos de coque sufren un alto grado de exposición, la población que vive en las zonas cercanas a estos establecimientos se encuentra también expuesta, de manera persistente, a estos contaminantes. Este grupo poblacional debe recibir la atención adecuada en cuanto a calidad del medio ambiente circundante.

A causa de las frecuentes emisiones accidentales de coque, en una zona industrial de la Provincia de Buenos Aires, se estudiaron los efectos de esta clase de MP sobre las vías aéreas, para lo cual se ha utilizado este diseño experimental basado en la instilación en animales.

Se ha descrito, en la primera parte de este trabajo, la utilización de MP proveniente de la combustión de carbón (CFA) fraccionado por tamaño en muestreos programados. En el caso del coque, el MP fue recolectado luego de un episodio de emisión accidental, por lo tanto no fue posible recolectar las muestras con un muestreador a fin de obtener partículas fraccionadas por

tamaño. No obstante se debe recalcar la importancia del estudio de los efectos de material de estas características debido a la carencia de información bibliográfica sobre el tema en lo que respecta a su efecto en el tracto respiratorio de la población expuesta.

Las muestras ambientales recolectadas en las cercanías de las viviendas fueron comparadas con muestras patrón e identificadas como partículas de coque.²⁰⁸ El análisis por DRX indica que la muestra A presenta 100% de coque calcinado y la muestra B, 40%-60% de coque calcinado-crudo por lo tanto existe una alta probabilidad de que A provenga de emisiones de las chimeneas de la coquería, mientras que una fracción importante de B provenga de las pilas de coque crudo depositado en la misma.

De los resultados obtenidos se ha concluido que la muestra A consiste en una matriz carbonosa con un alto contenido de grafito, que ha perdido una importante cantidad de moléculas orgánicas durante el proceso de calcinación. La muestra B, con importante contenido de coque crudo consiste en una matriz carbonosa amorfa, con un elevado número de moléculas orgánicas adsorbidas.²¹⁰ Esta diferencia estructural podría explicar los efectos mas importantes de la muestra B. Estudios comparativos en trabajadores de hornos de coque (donde se calcina coque crudo) y trabajadores de plantas de ánodo de aluminio (donde se utiliza coque calcinado), mostraron una mayor proporción de compuestos orgánicos en la orina de trabajadores de coque crudo.²⁰⁹ La identificación de los diferentes componentes de la fracción orgánica en nuestro material se realizará en el futuro.

Las DEP han sido profusamente analizadas en la literatura internacional y sus efectos sobre el tracto respiratorio están bien documentados. Por lo tanto las DEP han sido consideradas como material de referencia. Las DEP son partículas análogas al coque crudo en cuanto a sus matrices carbonosas con moléculas orgánicas adsorbidas: compuestos nitro-aromáticos en las DEP y benzo(a)pirenos en el coque.²¹⁰

El análisis de los efectos *in vivo* indica que la instilación de las muestras A y B genera aumentos importantes en el número total de células y de PMN en el BAL. Los MA de animales instilados con la muestra A presentan una mayor sobrecarga de partículas que los MA de animales instilados con B. Esto puede afectar la depuración del MP debido a que los MA que fagocitan una gran cantidad de material tenderían a acumularse en el alvéolo. Esto conduciría a una ineficiente depuración aumentando la respuesta inflamatoria.²¹¹

Las muestras A y B generan necrosis celular y activación de macrófagos presentes en BAL y estos efectos son mayores en el grupo instilado con B, indicando una posible influencia de la fracción orgánica de B en estas respuestas. Al respecto, se ha publicado que las DEP y sus compuestos orgánicos aislados producen efectos inflamatorios en el tracto respiratorio atribuidos a las moléculas orgánicas adsorbidas a la superficie de las mismas.¹³⁸

El pre-tratamiento con DMTU atenúa algunos parámetros inflamatorios sólo en el grupo instilado con la muestra B, lo que indicaría la participación de ROS en estos procesos. Los compuestos orgánicos adsorbidos serían los agentes efectores vía la generación de ROS.²¹² Este proceso se encuentra vinculado a la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos²¹³ y a los efectos mutagénicos de los compuestos orgánicos presentes.²¹⁴ Las ROS pueden generarse directamente por las partículas, como productos endógenos, o por el metabolismo de xenobióticos luego de la fagocitosis del MP.^{150, 151} La matriz carbonosa se considera un vector de entrada de compuestos orgánicos a la célula y la lenta disociación entre estos componentes contribuye a una sostenida estimulación.²¹⁵

Con respecto a la muestra urbana, las imágenes de MEB muestran que son partículas de tamaño respirable, carbonosas, constituidas además, por elementos de la corteza terrestre. Los resultados *in vivo* obtenidos luego de la IT de esta muestra indican que es capaz de aumentar el nivel de PMN y que sus efectos inflamatorios, a iguales masas instiladas, son menos potentes que los

encontrados en animales tratados con ambas muestras de coque, probablemente debido a la mayor homogeneidad del material en estas muestras. Los efectos inflamatorios no se revierten mediante la administración sistémica de DMTU, indicando que otros factores, independientes de ROS, podrían estar participando.

Estudios in vitro

En los estudios *in vitro* con CFA las fracciones F y C de ambos tipos de carbón producen activación de macrófagos y liberación de mediadores inflamatorios que podrían explicarse por el elevado contenido de cuarzo de estas fracciones. Hay trabajos previos que indican que una sobrecarga de cuarzo en MA produjo cantidades apreciable de TNF- α ²¹⁶ e IL-6.^{217,218} También se ha detectado un nivel importante de nitritos luego de la incubación con partículas F. En publicaciones previas se describe que estas partículas ejercen una mayor acción que las C en cuanto a la liberación de NO y que esto se debería a diferencias físico-químicas.²¹⁹

La significativa activación de macrófagos y la disminución en la generación de ROS luego del tratamiento con DMTU en cultivos tratados con la muestra B (enriquecida en coque crudo) son resultados *in vitro* cuya tendencia coincide con lo observado *in vivo*.

Con respecto a la muestra urbana se observó que ejerce menores efectos sobre MA que las partículas de coque. Estudios realizados sobre muestras similares, pero tomadas en otros lugares de la ciudad de Buenos Aires bajo diferentes condiciones, han señalado que los contenidos de MP y de azufre son elevados y se encuentran por encima de los estándares internacionales.⁴⁴ Sin embargo estos valores dependen de la localización geográfica del muestreo, de la estación del año, de factores meteorológicos y de la composición físico-química de las muestras. La heterogeneidad del MP urbano es la razón por la cual existe mucha discrepancia en la literatura en cuanto a la toxicidad de estas partículas.

En general los ensayos *in vitro* no muestran efectos diferenciales notorios entre los distintos tipos de MP sugiriendo que los ensayos *in vivo* en ratones constituyen un modelo de evaluación mas confiable. El empleo de líneas celulares o cultivos primarios de ratón podrían ser indicadores más sensibles que los cultivos primarios de MA de rata utilizados en este estudio.

La modulación de las funciones de los MA por la exposición a MP *in vitro* no ha podido se correlacionada con las diferentes estructuras y composición fisicoquímica de las partículas aquí estudiadas. Si bien los macrófagos han reaccionado frente al estímulo, estas respuestas no muestran especificidad para determinada partícula bajo nuestras condiciones experimentales. Es sabido que el sistema de cultivo celular es restringido y en este caso no representa el microambiente pulmonar en el cual coexisten varios tipos celulares, además de los MA, cuya interacción contribuye a los efectos observados *in vivo*.

CONCLUSIONES

-Este trabajo demuestra que el MP de origen antropogénico empleado en este estudio produce efectos pulmonares agudos significativos en animales experimentales. Estos efectos están condicionados por el origen, tamaño, y composición fisicoquímica del MP.

-EL MP proveniente de la combustión del carbón presenta un alto contenido de cuarzo y de metales. El origen y la composición de las muestras originales, carbón bituminoso (W Kentucky) y sub-bituminoso (Montana), determinan la composición fisico-química de las fracciones del CFA obtenidas: el carbón sub-bituminoso presenta mayor contenido de azufre y de hierro que el bituminoso.

-Las fracciones de CFA de menor tamaño se caracterizan por su alto contenido de metales. La fracción ultrafina presenta además un elevado contenido de sulfato de calcio. Las fracciones de mayor tamaño, no carbonosas, están constituidas por aluminosilicatos.

- El coque constituye MP proveniente de derivados del petróleo. El material analizado en este trabajo proviene de zonas aledañas a una coquería, luego de una emisión accidental. Está constituido por matrices carbonosas amorfas (coque crudo) o cristalinas (coque calcinado) y carece de metales. Es conocida su alta concentración de moléculas orgánicas.

-Ambos tipos de MP, de origen y características físico-químicas muy diferentes son capaces de generar procesos inflamatorios agudos.

-Los efectos pulmonares agudos del CFA se encuentran íntimamente relacionados con el tamaño de las partículas que lo componen y están asociados

al contenido de azufre, de cuarzo y de trazas de elementos del MP. Las partículas ultrafinas presentan mayor potencia inflamatoria *in vivo* que las finas o gruesas provenientes del mismo carbón. Masas iguales de partículas del mismo tamaño, provenientes de carbones de distinto rango, generan efectos de distinta magnitud: el CFA proveniente de un carbón bituminoso presenta efectos mayores que el proveniente de un carbón sub-bituminoso.

-El coque también ejerce efectos inflamatorios importantes a nivel pulmonar. El coque crudo ejerce sus efectos, en parte, mediante generación de ROS. Los efectos del coque crudo son más potentes que los del coque calcinado. Las moléculas orgánicas adsorbidas a la matriz carbonosa del coque crudo podrían tener una participación importante en la generación de estas respuestas.

-El MP de diferente composición físico-química y de diferente origen genera *in vitro* respuestas similares. No se han encontrado marcadores específicos que caractericen a una partícula determinada.

-En síntesis, los resultados indican que MP de diferente origen, que ha sido sometido a diferentes procesos y que posee diferente tamaño y composición físico-química, es capaz de generar respuestas inflamatorias importantes en los modelos biológicos estudiados. La presencia de cuarzo, metales y moléculas orgánicas presentes en el MP estudiado cumple un rol importante en estos procesos.

-Dado que el aparato respiratorio constituye la vía de entrada de estos contaminantes al organismo, la inflamación inicial constituye sólo el comienzo de una serie de eventos adversos para la salud bajo situaciones de exposición prolongadas a MP. Por esta razón es necesaria la implementación de políticas ambientales que conduzcan a un control más estricto en las emisiones de MP así

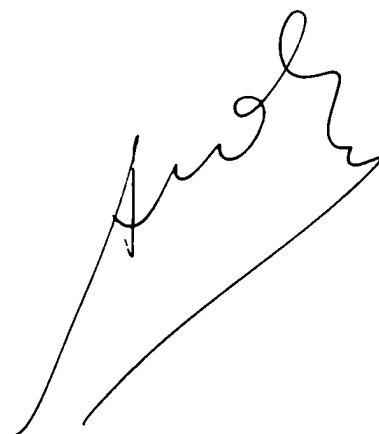
como a la generación de un registro y seguimiento de patologías asociadas a los mismos en nuestro país.

-Estos resultados experimentales que analizan efectos inmediatos producidos por material particulado presente habitualmente en el aire que respiramos, deben ser considerados en relación a la calidad del aire en zonas geográficas con importante actividad antropogénica. La injuria persistente a las vías aéreas de las personas que habitan estas zonas, puede producir afectos deletéreos a corto o largo plazo afectando la calidad de vida y la productividad del hombre.

Tesista: Silvia Evangelina O'Connor



Director: Beatriz Lucía Molinari



Fecha: 28 de octubre de 2004

REFERENCIAS

-
- 1 Abbey D, Hwang BL, Burchette RJ, Vancuren T, Millis PK. Estimated long-term ambient concentrations of PM₁₀ and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Arch Environ Health*. 50:139-152, 1995.
 - 2 Zhang J, Smith KR. Indoor air pollution: a global health concern. *Br Med Bull* 68:209-25, 2003.
 - 3 US EPA. Air quality criteria for Particulate Matter. EPA/600/P-95-001, 1996.
 - 4 Mészáros A, Vissy K. Concentration, size distribution and chemical nature of atmospheric aerosol particles in remote oceanic areas. *J Aerosol Sci* 5:101-109, 1974.
 - 5 McCain JD, Gooch JP, Smith WB. Results of field measurements of industrial particulate sources and electrostatic precipitator performance. *J Air Pollut Control Assoc* 25:117-121, 1957.
 - 6 Jantunen M, Hanninen O, Koistinen K, Hashim JH. Fine PM measurements: personal and indoor air monitoring. *Chemosphere* 49:993-1007, 2002.
 - 7 Yanosky JD, MacIntosh DL. A comparison of four gravimetric fine particle sampling methods. *J Air Waste Manage Assoc* 51:878-84, 2001.
 - 8 Natusch DFS, Wallace JR. Urban aerosol toxicity: The influence of particle size. *Science*. 186:695-699, 1974.
 - 9 Gudmundsson A, Petersen OH, Schneider T, Bohgard M. Particle size calibration between the aerodynamic particle sizer and optical microscope for wind tunnel studies with particles and fused alumina. *J Aerosol Sci* 22:347-350, 1991.
 - 10 Kildes J, Nielsen BH. Exposure assessment of airborne microorganisms by fluorescence microscopy and image processing. *Ann Occup Hyg* 41:201-216, 1997.
 - 11 US EPA. Air Quality Criteria for Particulate Matter. 600/P-99/002aB, 2001.
 - 12 Ostro BD, Sanchez JM, Aranda C, Eskeland GS. Air pollution and mortality. Results from Santiago, Chile. Policy Research Working Paper 1453. The World Bank, Washington DC, 1995.
 - 13 Dockery DW, Pope CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Ann Rev Public Health* 15:107-132, 1994.
 - 14 Medina S, Plasencia A, Ballester F, Mucke HG, Schwartz J. Apheis: public health impact of PM₁₀ in nineteen European cities. *J Epidemiol Community Health* 58:831-836, 2004.

-
- 15 Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manage Assoc* 46:927-939, 1996.
- 16 Dockery DW, Pope ACI, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 329:1753-1759, 1993.
- 17 Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet* 357:704-708, 2001.
- 18 Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect* 112:6-8, 2004.
- 19 Pope CA, Dockery DW. Acute health effects of PM₁₀ pollution on symptomatic and asymptomatic children. *Am Rev Respir Dis* 145:1123-1128, 1992.
- 20 Dassen W, Brunekreef B, Hoek G. Decline in children's pulmonary function during an air pollution episode. *J Air Pollut Control Assoc.* 36:1223-1227, 1986.
- 21 Woodruff TJ, Grillo J, Schoendorf KC. The relationship between selected causes of post-neonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States. *Environ Health Perspect* 105:608-612, 1997.
- 22 Svanes C, Omenaas E, Jarvis D, Chinn S, Gulsvik A, Burney P. Parental smoking in childhood and adult obstructive lung disease: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax* 59:295-302, 2004.
- 23 Ghio AJ, Carter JD, Richards JH, Richer LD, Grissom CK, Elstad MR. Iron and iron-related proteins in the lower respiratory tract of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Res Crit Care Med* 31:395-400, 2003.
- 24 Bigatello LM, Zapol WM. New approaches to acute lung injury. *Br J Anaesth* 77:99-109, 1996.
- 25 Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med.* 54:113-129, 2003.
- 26 Lamb D. Chronic bronchitis, emphysema, and the pathological basis of chronic obstructive pulmonary disease. *Spencer's Pathology of the Lung*. Hasleton P. Mc Graw-Hill Ed. 597-630, 1996.
- 27 Chalupa DC, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect* 112:879-882, 2004

-
- 28 Delfino RJ, Quintana PJ, Floro J, Gastanaga VM, Samimi BS, Kleinman MT, Liu L, Bufalino C, Wu CF, McLaren CE. Association of FEV1 in asthmatic children with personal and microenvironmental exposure to airborne particulate matter. *Environ Health Perspect* 112:932-941, 2004.
- 29 Loomis D, Castillejos M, Gold DR, McDonnell W, Borja-Aburto VH. Air pollution and infant mortality in Mexico City. *Epidemiology* 10:118-123, 1999.
- 30 Gouveia N, Fletcher T. Respiratory diseases in children and outdoor air pollution in Sao Paulo, Brazil: a time series analysis. *Occup Environ Med* 57:477-483, 2000.
- 31 Valent F, Little D, Bertollini R, Nemer LE, Barbone F, Tamburlini G. Burden of disease attributable to selected environmental factors and injury among children and adolescents in Europe. *Lancet* 363:2032-2039, 2004.
- 32 Adamkiewicz G, Ebelt S, Syring M, Slater J, Speizer FE, Schwartz J, Suh H, Gold DR. Association between air pollution exposure and exhaled nitric oxide in an elderly population. *Thorax* 59:204-209, 2004.
- 33 Rizzi M, Sergi M, Andreoli A, Pecis M, Bruschi C, Fanfulla F. Environmental tobacco smoke may induce early lung damage in healthy male adolescents. *Chest* 125:1387-1393, 2004.
- 34 Goe SK, Henneberger PK, Reilly MJ, Rosenman KD, Schill DP, Valiante D, Flattery J, Harrison R, Reinisch F, Tumpowsky C, Filios MS. A descriptive study of work aggravated asthma. *Occup Environ Med* 61:512-517, 2004.
- 35 Kim JY, Mukherjee S, Ngo LC, Christiani DC. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect* 112:666-671, 2004.
- 36 Von Schirnding Y. Health and sustainable development: can we rise to the challenge? *Lancet* 360:632-677, 2002.
- 37 Osier M, Oberdörster G. Intratracheal inhalation versus intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fund Appl Toxicol* 40:220-227, 1997.
- 38 Dorries A, Valberg P. Heterogeneity of phagocytes for inhaled versus instilled material. *Am. Rev. Respir. Dis* 146:831-837, 1992.
- 39 Pritchard J, Holmes A, Evans J, Evans N, Evans R, Morgan A. The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. *Environ Res* 36:268-297, 1985.

-
- 40 Ferin J, Feldstein M. Pulmonary clearance and hilar lymph node content in rats after particle exposure. *Environ Res* 16:342-352, 1978.
- 41 Brain J, Knudson D, Sorokin S, Davis M. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ Res* 11:13-33, 1976.
- 42 The World Bank. La contaminación ambiental en la Argentina, 1995.
- 43 Smichowski P, Gómez DR, Dawidowski LE, Giné MF, Sánchez Bellato AC, Reich SL. Monitoring trace metals in urban aerosols from Buenos Aires city by plasma. *J Environ Monit* 6:1-10, 2004.
- 44 Bogo H, Otero M, Castro P, Azafrán MJ, Kreiner A, Calvo EJ, Negri RM. Study of atmospheric particulate matter in Buenos Aires City. *Atmos Environ* 37:1135-1147, 2003.
- 45 Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Ministerio de Salud y Ambiente, República Argentina. Decreto N° 779/95. Artículo N°33. Aprobación de la Reglamentación de la Ley N° 24.449 (Ley de Tránsito y seguridad vial).
- 46 Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente Humano, Ministerio de Salud y Ambiente, República Argentina. Resolución No 708/96. Normas de medición de concentración de gases y material particulado emitidos por chimeneas.
- 47 Matos EL, Vilensky M, Mirabelli D, Boffetta P. Occupational exposures and lung cancer in Buenos Aires, Argentina. *J Occup Environ Med* 42:653-659, 2000.
- 48 Massolo L, Muller A, Tueros M, Rehwagen M, Franck U, Ronco A, Herbarth O. Assessment of mutagenicity and toxicity of different-size fractions of air particulates from La Plata, Argentina, and Leipzig, Germany. *Environ Toxicol* 17:219-231, 2002.
- 49 Muller A, Alzuet P, Herbarth O, Ronco A. Assessment of toxicity and mutagenicity in air particulate matter from an urban industrial area in the coast of the Rio de la Plata. *Environ Toxicol* 16:151-157, 2001.
- 50 Gonzalez CM, Pignata ML. Chemical response of the lichen *Punctelia subrudecta* transplanted close to a power station in an urban-industrial environment. *Environ Pollut* 97:195-203, 1997.
- 51 Gonzalez CM, Pignata ML. Chemical response of transplanted lichen *Canomaculina pilosa* to different emission sources of air pollutants. *Environ Pollut* 110:235-242, 2000.
- 52 Wannaz ED, Zygadlo JA, Pignata ML. Air pollutants effect on monoterpenes composition and foliar chemical parameters in *Schinus areira*. *Sci Tot Environ* 305:177-193, 2003.

-
- 53 McElroy MW, Carr RC, Ensor DS, Markowski GR. Size distribution of fine particles from coal combustion. *Science* 215:13-19, 1982.
- 54 Lighty JS, Veranth JM, Sarofim AF. Combustion aerosols: factors governing their size and composition and implications to human health. *J Air Waste Manag Assoc* 50:1565-1618; 2000.
- 55 Bérubé KA, Jones TP, Williamson BJ. Electron microscopy of urban airborne particulate matter. *Microsc Annal* 49:9-11, 1997.
- 56 Westerholm RN, Jacob A, Li H. Chemical and biological characterization of particulate-semivolatile and gas-phase-associated compounds in diluted heavy-duty diesel exhausts: a comparison of three different semivolatile-phase samplers. *Environ Sci Technol* 25:332-338, 1991.
- 57 Robbins. *Patología Estructural y Funcional. Capítulo 4: Inflamación*. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. Sexta Edición, 1999.
- 58 Bennett WD, Zeman KL, Kang CW, Schechter MS. Extrathoracic deposition of inhaled coarse particles in children versus adults. *Ann Occup Hyg* 41:497-502, 1997.
- 59 Strom KA, Johnson JT, Chan TL. Retention and clearance of inhaled submicron carbon black particles. *J Toxicol Environ Health* 26:183-202, 1989.
- 60 Brain JD, Valberg PA. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 120:1325-1373, 1979.
- 61 Brain DJ. Lung macrophages. How many kinds are there? What do they do? *Am Rev Respir Dis* 137:507-509, 1988.
- 62 Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI, Hartsky MA. Inhalation of concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:10-22, 1997.
- 63 Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 183:1865-1878, 1996.
- 64 Calderón-Garcidueñas L, Osnaya-Brizuela N, Ramirez-Martinez L, Villarreal-Calderón A. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithellum are induced upon exposure to urban pollution. *Environ Health Perspect* 104:160-168, 1996.
- 65 Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, Kamp DW. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:180-187, 2003.

-
- 66 Dai J, Gilks B, Price K, Churg A. Mineral dusts directly induce epithelial and interstitial fibrogenic mediators and matrix components in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1907-1913, 1998.
- 67 Churg A, Wright JL. Airway wall remodeling induced by occupational mineral dusts and air pollutant particles. *Chest* 122:306-309, 2002.
- 68 Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC, Nyska A. Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci* 71:237-45, 2003.
- 69 Calderón-Garcidueñas L, Devlin RB, Miller FJ. Respiratory tract pathology and cytokine imbalance in clinically healthy children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Medical Hypotheses* 55:373-378, 2000.
- 70 Blanchet S, Ramgolam K, Baulig A, Marano F, Baeza-Squiban A. Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 30:421-427, 2003.
- 71 Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:655-677, 1995.
- 72 Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 122:314-320, 2002.
- 73 Nam HY, Choi BH, Lee JY, Lee SG, Kim YH, Lee KH, Yoon HK, Song JS, Kim HJ, Lim Y. The role of nitric oxide in the particulate matter (PM_{2.5}) induced NFκB activation in lung. *Toxicol Lett* 148:95-102, 2004.
- 74 Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Jiang NF, Rochelle LG, Akley NJ, Dreher KL, Adler KB. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect* 105:1301-1307, 1997.
- 75 Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K. Adverse Health Effects of PM₁₀ Particles: Involvement of iron in generation of hydroxyl radicals. *Occup Environ Med* 53:817-822, 1996.
- 76 Ghio AJ, Taylor DE, Stonehuerner JG, Piantadosi CA, Crumbliss AL. The release of iron from different asbestos structures by hydrogen peroxide with concomitant O₂ generation. *BioMetals* 11:41-47, 1998.
- 77 Zhu S, Manuel M, Tanaka S, Choe N, Kagan E, Matalon S. Contribution of reactive oxygen and nitrogen species to particulate-induced lung injury. *Environ Health Perspect* 106:1157-1163, 1998.

-
- 78 Li XY, Brown DM, Smith S, MacNee W, Donaldson K. Inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 11:709-731, 1999.
- 79 Gusev VA, Danilovskaja YV, Vatulkina OY, Lomonosova OS, Velichkovsky BT. Effect of quartz and alumina dust on generation of superoxide radicals and hydrogen peroxide by alveolar macrophages, granulocytes, and monocytes. *Br J Ind Med* 50:732-735, 1993.
- 80 Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Interleukin-8: the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* 17:17-23, 1991.
- 81 Deforge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of Interleukin-8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 268:25568-25576, 1993.
- 82 Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, Carre P, Pipy B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF- α production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol* 156:1540-1548, 1996.
- 83 Porter DW, Millecchia L, Robinson VA, Hubbs A, Willard P, Pack D, Ramsey D, McLaurin J, Khan A, Landsittel D, Teass A, Castranova V. Enhanced nitric oxide and reactive oxygen species production and damage after inhalation of silica. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:485-493, 2002.
- 84 Tanaka S, Choe N, Hemenway DR, Zhu S, Matalon S, Kagan E. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J Clin Invest* 102:445-454, 1998.
- 85 Quinlan TR, Berube KA, Hacker MP, Taatjes DJ, Timblin CR, Goldberg J, Kimberley P, O'Shaughnessy P, Hemenway D, Torino J, Jimenez LA, Mossman BT. Mechanisms of asbestos induced nitric oxide production by rat alveolar macrophages in inhalation and in vitro models. *Free Radic Biol Med* 24:778-788, 1998.
- 86 Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: Effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:637-648, 1996.
- 87 Jimenez LA, Drost EM, Gilmour PS, Rahman I, Antonicelli F, Ritchie H, MacNee W, Donaldson K. PM10 exposed macrophages stimulate a pro-inflammatory response in lung epithelial cells via TNF- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:237-248, 2002.
- 88 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* 146:180-188, 1997.

-
- 89 Quay JL, Reed W, Samet J, Devlin RB. Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF κ B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:98-106, 1998.
- 90 Veronesi B, Oortgiesen M. Neurogenic inflammation and particulate matter air pollutants. *Neurotoxicol* 22:795-810, 2001.
- 91 Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Ponce de León Rosales S, Miranda J, Rosas I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 111:1289-1293, 2003.
- 92 Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles?. *J Air Waste Manage Assoc.* 10:927-939, 1996
- 93 Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis D. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect* 106:849-855, 1998.
- 94 Hunt A, Abraham JL, Judson B, Berry CL. Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. *Environ Health Perspect* 111:1209-1214, 2003.
- 95 Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Chung A. Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect* 109:1039-1043, 2001.
- 96 Ibald-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 15:189-201, 2002.
- 97 Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 15:213-220, 2002.
- 98 Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:191-199, 2001.
- 99 Hohr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* 205:239-244, 2002.
- 100 Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* 57:685-691, 2000.

-
- 101 Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst* 110:1-65, 2002.
- 102 Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* 149:243-253, 2004.
- 103 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16:437-445, 2004.
- 104 Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* 15:39-52, 2003.
- 105 Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 61:442-447, 2004.
- 106 Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* 53:423-438, 1998.
- 107 Dick CA, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S, Gilmour MI. Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *J Toxicol Environ Health A* 66:2193-2207, 2003.
- 108 Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res* 29:29-44, 2003.
- 109 Zelikoff JT, Schermerhorn KR, Fang K, Cohen MD, Schlesinger RB. A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter. *Environ Health Perspect* 110:871-875, 2002.
- 110 Kodavanti UP, Hauser R, Christiani DC, Meng ZH, McGee J, Ledbetter A, Richards J, Costa DL. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol Scii* 43:204-212, 1998.
- 111 Kennedy T, Ghio AJ, Reed W, Samet J, Zagorski J, Quay J, Carter J, Dailey L, Hoidal JR, Devlin RB. Copper-dependent inflammation and nuclear factor- κ B activation by particulate air pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:366-378, 1998.

-
- 112 Lund LG, Aust AE. Iron-catalyzed reactions may be responsible for the biochemical and biological effects of asbestos. *Biofactors* 3:83-89, 1991.
- 113 Smith RK, Veranth JM, Lighty JS, and. Aust AE. Mobilization of iron from coal fly ash was dependent upon the particle size and the source of coal. *Chem Res Toxicol* 11:1494-1500, 1998.
- 114 Amdur MO, Bayles J, Ugro V, Underhill DW. Comparative irritant potency of sulfate salts. *Environ Res* 16:1-8, 1978.
- 115 Busch RH, Buschbom RL, Cannon WC, Lauhala KE, Miller FJ, Graham JA, Smith LG. Effects of ammonium sulfate aerosol exposure on lung structure of normal and elastase-impaired rats and guinea pigs. *Environ Res* 33:454-472, 1984.
- 116 Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:671-679, 2003.
- 117 Rengasamy A, Barger MW, Kane E, Ma JK, Castranova V, Ma JY. Diesel exhaust particle-induced alterations of pulmonary phase I and phase II enzymes of rats. *J Toxicol Environ Health A* 66:153-167, 2003.
- 118 Bice DE, Hahn FF, Benson J, Carpenter RL, Hobbs CH. Comparative lung immunotoxicity of inhaled quartz and coal combustion fly ash. *Environ Res* 43:74-389, 1987.
- 119 Dogra S, Khanna AK, Kaw JL. Alterations in the pulmonary and systemic immune response in rats exposed to coal fly ash. *Immunopharmacol* 29:103-109, 1995.
- 120 Dormans JA, Steerenberg PA, Arts JH, van Bree L, de Klerk A, Verlaan AP, Bruijntjes JP, Beekhof P, van Soolingen D, van Loveren H. Pathological and immunological effects of respirable coal fly ash in male Wistar rats. *Inhal Toxicol* 11:51-69, 1999.
- 121 Chauhan SS, Singh SK, Misra UK. Induction of pulmonary and hepatic cytochrome P-450 species by coal fly ash inhalation in rats. *Toxicology* 56:95-105, 1989.
- 122 Takahashi S, Esaka F, Sato H, Kubota Y, Kikuchi T, Furuya K. Concentrations of metal elements in mouse lung after intratracheal administration of coal fly ash. *Inhal Toxicol* 6:67-77, 1994.
- 123 Hatch GE, Boykin E, Graham JA, Lewtas JE, Pott F, Loud K, Mumford JL. Inhalable Particles and Pulmonary Host Defenses: In vivo and in vitro effects of ambient air and combustion particles. *Environ. Res* 36:67-79, 1985.

-
- 124 Lewis RJ, Schnatter AR, Drummond I, Murray N, Thompson FS, Katz AM, Jorgensen G, Nicolich MJ, Dahlman D, Theriault G. Mortality and cancer morbidity in a cohort of Canadian petroleum workers. *Occup Environ Med* 60:918-928, 2003.
- 125 Costantino JP, Redmond CK, Bearden A. Occupationally related cancer risk among coke oven workers: 30 years of follow-up. *Occup Environ Med* 37:597-604, 1995.
- 126 Finkelstein MM. Lung cancer among steelworkers in Ontario. *Am J Ind Med* 26:549-557, 1994.
- 127 Swaen GM, Slangen JJ, Volovics A, Hayes RB, Scheffers T, Sturmans F. Mortality of coke plant workers in The Netherlands. *Br J Ind Med* 48:130-135, 1991.
- 128 Wu MT, Pan CH, Wu TN, Huang YL, Chen CY, Huang LH, Ho CK. Immunological findings in a group of coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup Environ Med* 45:1034-1039, 2003.
- 129 Winker N, Tuschl H, Kovac R, Weber E. Immunological investigations in a group of workers exposed to various levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol* 17:23-29, 1997.
- 130 Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ Health Perspect* 102:302-304, 1994.
- 131 Dobias L, Kusova J, Gajdos O, Vidova P, Gajdosova D, Havrankova J, Fried M, Binkova B, Topinka. Bioassay, directed chemical analysis and detection of mutagenicity in ambient air of the coke oven. *Mutat Res* 445:285-293, 1999.
- 132 Krokje A, Schmid R, Zahlsen K. Liver, lung and kidney homogenates used as an activation system in mutagenicity studies of airborne particles and of expectorate and urine samples from exposed workers in a coke plant. *Mutat Res* 259:49-65, 1991.
- 133 Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Fan Chung K, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 162:161-166, 2000.
- 134 Nordenhall C, Pourazar J, Ledin MC, Levin JO, Sandstrom T, Adelroth E. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 17:909-915, 2001.
- 135 Pope CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* 138:890-899, 1999.

-
- 136 Peters A, Perz S, Doring A, Stieber J, Koenig W, Wichmann HE. Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am J Epidemiol* 150:1094-1098, 1999.
- 137 Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103:2810-2815, 2001.
- 138 Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y. Biological effects of diesel exhaust particles. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med* 14:37-47, 1993.
- 139 Ichinose T, Furuyama A, Sagai M. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). Acute toxicity of DEP introduced into lung by intratracheal instillation. *Toxicology* 99:153-167, 1995.
- 140 Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and pro-thrombotic effects. *Toxicol Lett* 149:243-253, 2004.
- 141 Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M and Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:25-32, 2000.
- 142 Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel Exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:671-679, 2003.
- 143 Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:25-32, 2000.
- 144 Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y, Takano H, Kumagai Y, Shimojyo N, Devalia JL, Sagai M. Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Radic Biol Med* 25:635-644, 1998.
- 145 Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880, 1978.
- 146 Klebanoff SJ. Oxygen metabolites and phagocytes. Basic principles and clinical inflammation correlates. Gallin JI, et al (eds): New York, Raven Press, 541-589, 1992.
- 147 Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 65:49-95, 1992.
- 148 Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 307:108-112, 1992.

-
- 149 Weinberg, J. B. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes. *Mol Med* 4:557-591, 1998.
- 150 Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, Sagai M. Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome p450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radical Biol Med* 22:479-487, 1997.
- 151 Marshall MV, McLemore TL, Martin RR, Jenkins WT, Snodgrass DR, Corson MA, Arnott MS, Wray NP, Griffin A. Patterns of benzo[alpha]pyrene metabolism in normal human pulmonary alveolar macrophages. *Cancer Lett* 8:103-109, 1979.
- 152 Harris CC, Hsu IC, Stoner GD, Trump BF, Selkirk JK. Human pulmonary alveolar macrophages metabolize benzo(a)pyrene to proximate and ultimate mutagens. *Nature* 272:633-634, 1978.
- 153 Van Grevenynghe J, Sparfel L, Le Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R, Fardel O. Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 317:708-716, 2004.
- 154 Piipari R, Nurminen T, Savela K, Hirvonen A, Mantyla T, Anttila S. Glutathione S-transferases and aromatic DNA adducts in smokers' bronchoalveolar macrophages. *Lung Cancer* 39:265-72, 2003.
- 155 Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147, 1996.
- 156 Beutler B. TNF- α , immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Med* 43: 227-235, 1995.
- 157 Shi MM, Chong I, Godleski JJ, Paulauskis JD. Regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression by oxidative stress in rat alveolar macrophages. *Immunology* 97:309-315; 1999.
- 158 Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 329:2002-2012, 1993.
- 159 Linak WP, Miller CA, Wendt JOL. Comparison of particle size distributions and elemental partitioning from the combustion of pulverized coal and residual fuel oil. *J Air Waste Manage Assoc* 50:1532-1544, 2000.
- 160 Snow GC, Lorrain JM. Evaluation of Innovative Combustion Technology for Simultaneous Control of SO_x and NO_x. EPA-600/2-87-032, 1987.
- 161 Linak WP, Miller CA, Seames WS, Wendt JOL, Ishinomori T, Endo Y, Miyamae S. On Trimodal Particle size distributions in fly ash from pulverized coal combustion. *Proceedings of the Combustion Institute* 29, 2002.

-
- 162 Linak WP, Srivastava RK, Wendt JOL. Metal aerosol formation in a laboratory swirl flame incinerator. *Combust Sci Technol* 101:7-27, 1994.
- 163 Base de datos de Difracción proporcionada por la ICDD (International Center for Diffraction Data), 2000.
- 164 Eldred R, Cahill T, Feeney P. *Nucl Instr Meth* 22: 289-295, 1987.
- 165 Filman DJ, Brawn RJ, Dandliker WB. Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody dependent complement mediated cell damage. *J Immunol Methods* 6:189-208, 1975.
- 166 Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-124, 1985.
- 167 Wright DG, Bralove DA, Gallin JI. The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am J Pathol* 87:237-84, 1977.
- 168 Ward C, Duddridge M, Fenwick J, Gardiner PV, Fleetwood A, Hendrick DJ, Walters EH. Evaluation of albumin as a reference marker of dilution in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic and control subjects. *Thorax* 48:518-522, 1993.
- 169 Sloan EP, Crawford DR, Schneider DL. Isolation of plasma membrane from human neutrophils and determination of cytochrome b and quinone content. *J Exp Med* 153:1316-28, 1981.
- 170 Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Annal Biochem* 79:544-552, 1977.
- 171 Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*. 68:167-175, 1984.
- 172 Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 278:971-976, 1968.
- 173 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126:131-138, 1982.
- 174 Gilmour MI, O'Connor S, Dick CA, Miller CA, Linak WP. Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *J Air Waste Manag Assoc* 54:286-95, 2004.
- 175 Molinari BL, Tasat DR, Palmieri MA, O'Connor SE, Cabrini RL. A cell-based quantitative evaluation of the MTT assay. *Anal Cytol Histol* 25:254-262, 2003.

-
- 176 Chen B, Hong C, Kan H. Exposures and health outcomes from outdoor air pollutants in China. *Toxicology* 198:291-300, 2004.
- 177 Borm PJ. Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA). *Ann Occup Hyg* 41:659-76, 1997.
- 178 Hatch GE, Boykin E, Graham JA, Lewtas JE, Pott F, Loud K, Mumford JL. Inhalable particles and pulmonary host defenses: in vivo and in vitro effects of ambient air and combustion particles. *Environ Res* 36:67-79, 1985.
- 179 Damle AS, Ensor DS, Ranade M.B. Coal combustion aerosol formation mechanisms. *Aerosol Sci Technol* 1:119-133, 1982.
- 180 Linak PL & Wendt JOL: Toxic metal emissions from incineration: Mechanisms and control. *Prog Energy Combust Sci* 19:145-185, 1993
- 181 Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 61:442-447, 2004.
- 182 Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, Vincent R, van Eeden SF. Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:34-41, 2002.
- 183 Mukae H, Vincent R, Quinlan K, English D, Hards J, Hogg JC, van Eeden SF. The effect of repeated exposure to particulate air pollution on the bone marrow. *Am J Respir Crit Care* 163:201-209, 2001
- 184 Driscoll KE. TNF- α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett* 112:177-183, 2000.
- 185 Ning Y, Tao F, Qin G, Imrich A, Goldsmith CA, Yang Z, Kobzik L. Particle-epithelial interaction: effect of priming and bystander neutrophils on interleukin-8 release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:744-750, 2004.
- 186 Roberts ES, Richards JH, Jaskot R, Dreher KL. Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology. *Inhal Toxicol* 15:1327-1346, 2003.
- 187 Clarke RW, Antonini JM, Hemenway DR, Frank R, Kleeberger SR, Jakab GJ. Inhaled particle-bound sulfate: effects on pulmonary inflammatory responses and alveolar macrophage function. *Inhal Toxicol* 12:169-186, 2000.

-
- 188 Amdur MO, Sarofim AF, Neville M, Quann RJ, McCarthy J, Elliot JF, Lam HF, Rogers AE, Conner MW. Coal combustion aerosols and SO₂: an interdisciplinary analysis. *Environ Sci. Technol* 20:138-145, 1986.
- 189 Zelikoff JT, Sisco MP, Yang Z, Cohen MD, Schlesinger RB. Immunotoxicity of sulfuric acid aerosol: effects on pulmonary macrophage functional activities critical for maintaining host resistance against infectious diseases. *Toxicology* 92:269-86, 1994.
- 190 Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 155:1376-1383, 1997.
- 191 Vallyathan V, Castranova V, Pack D, Leonard S, Shumaker J, Hubbs AF, Shoemaker DA, Ramsey DM, Pretty JR, Mc Laurin JL, et al. Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals. *Am J Respir Crit Care Med*. 152:1003-1009, 1995.
- 192 Kuempel ED, Attfield MD, Vallyathan V, Lapp NL, Hale JM, Smith RJ, Castranova V. Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust:dose-response *Biosci* 28:61-69, 2003.
- 193 Duffin R, Gilmour PS, Schins RPF, Clouter A, Guy K, Brown DM, MacNee W, Borm PJ, Donaldson K, Stone V. Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression and nuclear factor- κ B activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:10-17, 2001.
- 194 Albrecht C, Adolf B, Weishaupt C, Hohr D, Zeittrager I, Friemann J, Borm PJ. Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung. *Inhal Toxicol* 13:191-205, 2001.
- 195 Donaldson K, Borm PJ. The quartz hazard: a variable entity. *Ann Occup Hyg* 42:287-294, 1998.
- 196 Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- α induced oxidant stress. *Am J Physiol* 276:979-988, 1999.
- 197 Chen LC, Lam HF, Kim EJ, Guty J, Amdur MO. Pulmonary effects of ultrafine coal fly ash inhaled by guinea pigs. *J Toxicol Environ Health* 29:169-184, 1990.
- 198 Smith KR, Veranth JM, Lighty JS, Aust AE. Mobilization of iron from Coal Fly Ash was dependent upon the particle size and the source of coal. *Chem Res Toxicol* 11:1494-1500, 1998.
- 199 Veranth JM, Smith KR, Huggins F, Hu AA, Lighty JS, Aust AE. Mössbauer spectroscopy indicates that iron in an aluminosilicate glass phase is the source of the bioavailable iron from coal fly ash. *Chem Res Toxicol* 13:161-164, 2000.
- 200 Ball BR, Smith KR, Veranth JM, Aust AE. Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhal Toxicol* 12:209-225, 2000.

-
- 201 Smith KR, Aust AE. Mobilization of iron from urban particulates leads to generation of Reactive Oxygen Species in vitro and induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 10:828-834, 1997.
- 202 Smith KR, Veranth JM, Hu AA, Lighty JA, Aust AE. Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to Coal Fly Ash and vary with the bioavailability of iron as a function of particle size and source of coal. *Chem Res Toxicol* 13:118-125, 2000.
- 203 Prieditis H, Adamson IY. Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* 28:563-576, 2002.
- 204 Adamson IY, Prieditis H, Hedgecock C, Vincent R. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicol Appl Pharmacol* 166:111-119, 2000.
- 205 Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, Samet JM, McGee J, Richards JH, Costa DL. Pulmonary and systemic effects of zinc-containing emission particles in three rat strains: multiple exposure scenarios. *Toxicol Sci* 70:73-85, 2002.
- 206 Richards RJ, Atkins J, Marrs TC, Brown RFR, Masek LC. The biochemical and pathological changes produced by the intratracheal instillation of certain components of zinc hexachloroethane smoke. *Toxicol Lett* 54:79-88, 1989.
- 207 Gordon T, Chen LC, Fine JM, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA, Amdur MO. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats and rabbits. *Am Ind Hyg Assoc J* 53:503-509, 1992.
- 208 Miyagusuku M, Villegas M, Dawidowski LE, Gómez DE. Origen de partículas carbonosas en una muestra ambiental. *Libro SETAC LA* 1:74, 2003.
- 209 Pavanello S, Gabbani G, Mastrangelo G, Brugnone F, Maccacaro G, Clonfero E. Influence of GSTM1 genotypes on anti-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAH. *Int Arch Occup Environ Health* 72:238-46, 1999.
- 210 Williams R, Sparacino C, Petersen B, Bumgarner J, Jungers RH, Lewtas J. Comparative characterization of organic emissions from Diesel Particles, coke oven mains, roofing tar vapors and cigarette smoke condensate. *Int J Environ Anal Chem* 26:27-49, 1986.
- 211 Negishi T. Lung clearance of particles following excessive deposition of fly ash in golden hamsters. *Exp Anim*. 44:131-8, 1995.

-
- 212 Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutat Res* 562:119-131, 2004.
- 213 Ng D, Kokot N, Hiura T, Faris M, Saxon A, Nel A. Macrophage activation by polycyclic aromatic hydrocarbons: evidence for the involvement of stress-activated protein kinases, AP-1 and anti-oxidant response element. *J Immunol* 161:942-951, 1998.
- 214 Ichinose T, Yajima Y, Nagashima M, Takenoshita S, Nagamachi Y, Sagai M. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 18:185-192, 1997.
- 215 Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 163:5582-5591, 1999.
- 216 Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS. Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:547-554, 1995.
- 217 Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter JM, Kunkel SL, Quinlan TR, Mossman BT. TNF- α and increased chemokine expression in rat lung after particles exposure. *Toxicol Lett* 82: 483-489, 1995.
- 218 Balduzzi M, Diociaiuti M, De Berardis B, Paradisi S, Paoletti L. In vitro effects on macrophages induced by noncytotoxic doses of silica particles possibly relevant to ambient exposure. *Environ Res* 96:62-71, 2004.
- 219 Diociaiuti M, Balduzzi M, De Berardis B, Cattani G, Stacchini G, Ziemacki G, Marconi A, Paoletti L. The two PM_{2.5} and PM_{2.5-10} fractions: evidence of different biological activity. *Environ Res* 86:254-62, 2001.