

Efecto de contaminantes ambientales particulados sobre individuos de diferentes grupos etarios

Autor: Agustín Ostachuk

Director: Deborah Tasat



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente
(CESyMA)

Escuela de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de General San Martín
(UNSAM)

Tesis de Licenciatura

Tema: Efecto de contaminantes ambientales particulados sobre individuos de diferentes grupos etarios

Alumno: Agustín Ignacio Ostachuk

Lugar de trabajo: Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente (CESyMA)
Escuela de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de General San Martín

Director del trabajo: Dra. Deborah Tasat

Fecha de iniciación: agosto de 2002

Fecha de finalización: octubre de 2003

Fecha de examen: 22 de diciembre de 2003

Jurado: Dra. María del Carmen Ríos de Molina (FCEyN, UBA)
Ing. Darío Gómez (CNEA)
Dr. Gustavo Curutchet (ECyT, UNSAM)

Trabajo final de Tesis aprobado por:

Autor

Director

Director de la Comisión de Tesis de Licenciatura

*Para los que quiero y me quieren porque soy.
Para los que aman lo invisible,
se comprometen con la Verdad
e ignoran lo superficial y lo pasajero.
Para Carolina, mi novia, mi amiga, mi compañera.
Para Federico, mi amigo de la infancia, mi amigo de fierro.
Para Cristian, amigo, guía, ejemplo, todo en uno.
Para mis abuelos, no hay nada que pueda decir que los describa. Te extraño abue.
Para mi vieja, te entiendo y por eso te quiero.
Gracias por todo lo que hiciste por nosotros.*

- Este trabajo fue realizado con el apoyo y reconocimiento de una Beca de Investigación para Estudiantes Avanzados de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM).

- Parte de este trabajo fue presentado en el Congreso Internacional de la SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) realizado en el año 2003 en Portugal:

Residual Oil Fly Ash (ROFA) and Buenos Aires (UAP-BA) soluble fraction effects in young and aged rat lung cells

Ostachuk A, Martin S, Evelson P, Mandalunis P, Dawidowski L, Tasat DR
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) European Annual Meeting, Abril 28 – Mayo 1, Lisboa, Portugal.

- Parte de este trabajo fue publicado en la revista internacional *Environmental Research* en el año 2008:

Age-related lung cell response to urban Buenos Aires air particle soluble fraction

Ostachuk A, Evelson P, Martin S, Dawidowski L, Yakisich S, Tasat DR
Environmental Research. 2008. 107(2): 170-177.

Efecto de contaminantes ambientales particulados sobre individuos de diferentes grupos etarios

Resumen

Numerosos estudios epidemiológicos han asociado episodios de altas concentraciones de material particulado con incrementos en admisiones hospitalarias y enfermedades cardiorrespiratorias. El esfuerzo actual se centra en identificar los componentes y características del material particulado, y en identificar los mecanismos por los cuales este material ejerce sus efectos adversos sobre la salud. El material particulado no afecta de la misma manera a toda la población, existen diversos factores que determinan distintos grados de susceptibilidad a la contaminación ambiental. La edad es uno de los factores más reconocidos. Con el objeto de estudiar el efecto de contaminantes ambientales particulados sobre individuos de diferentes grupos etarios, células pulmonares obtenidas por lavado bronqueoalveolar de ratas Wistar macho jóvenes (1-2 meses) y adultas (8-9 meses) fueron incubadas por 2 hs. a 37°C con distintas concentraciones de la fracción soluble de la ROFA (Residual Oil Fly Ash) (0-200 µg/ml), material particulado con efectos adversos marcados sobre la salud. Se realizó también un estudio parcial con un contaminante ambiental particulado recolectado en la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA). El modelo actual que trata de explicar los efectos perjudiciales de los contaminantes ambientales particulados con un diámetro aerodinámico promedio menor a 2.5 µm, se basa en la capacidad de estos contaminantes de producir o inducir la producción de radicales libres. Por esta razón, el trabajo se centró en el estudio del balance oxidante-antioxidante en el modelo propuesto. Se estudió también el efecto de la fracción soluble de la ROFA (ROFA_{sf}) y de la UAP-BA (UAP-BA_{sf}) sobre la viabilidad celular, apoptosis y fagocitosis. La ROFA_{sf} causó necrosis a una concentración tan baja como 10 µg/ml en las poblaciones celulares provenientes de animales jóvenes y adultos. La viabilidad celular fue dependiente de la dosis de la ROFA_{sf} y cayó aproximadamente a un 70 % en ambas poblaciones celulares cuando fueron incubadas con 200 µg/ml.

La ROFA_{sf} indujo una producción incrementada de especies reactivas del oxígeno, con un efecto mayor sobre las células provenientes animales adultos. Por su parte, la capacidad antioxidante en adultos resultó ser la mitad de la correspondiente a los jóvenes. La ROFA_{sf} (200 µg/ml) provocó un aumento significativo en los índices de apoptosis de ambas poblaciones celulares, pero en niveles que probablemente no tengan importancia a nivel biológico. Por último, la actividad fagocítica fue significativamente mayor en adultos que en jóvenes y la exposición a 200 µg/ml de la ROFA_{sf} indujo un incremento del 20 % en la población celular proveniente de animales adultos. Por su parte, 10 µg/ml de UAP-BA_{sf} causó un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (1.5 veces mayor en adultos que en jóvenes), mientras que no produjo cambios significativos sobre los índices de apoptosis y fagocitosis. Estos resultados indican que las células provenientes de animales adultos son más susceptibles a la exposición a la ROFA_{sf} y UAP-BA_{sf}, y que una menor capacidad antioxidante de estas células determina la ocurrencia temprana de situaciones de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es considerado un factor fundamental en la generación de procesos inflamatorios, y esta sería probablemente la causa de la mayor susceptibilidad de la subpoblación de edad avanzada a contraer enfermedades cardiopulmonares.

Introducción

Numerosos estudios epidemiológicos han asociado episodios de alta polución por material particulado con una incidencia incrementada en la mortalidad y ocurrencia de enfermedades cardiorrespiratorias (Schwartz *et. al.*, 1992; Thurston *et. al.*, 1992; Pope *et. al.*, 1995).

El material particulado está formado por una composición variable y compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos: contaminantes microbianos, polen, metales, sulfatos y nitratos (Lioy *et. al.*, 1986; May *et. al.*, 1992). La ROFA (*residual oil fly ash*) es un material producido por la combustión de productos del petróleo a nivel industrial. Este material está constituido por partículas de un diámetro medio de 0,5 μm y alrededor del 90 % de su composición es inorgánica. Los principales elementos presentes en la ROFA son azufre, vanadio, níquel, hierro, sodio, sílice y magnesio (Dreher *et. al.*, 1996).

Las partículas ambientales inhaladas con un diámetro menor a 2.5 μm , o la fracción soluble de ellos, alcanzan las vías aéreas inferiores, los alvéolos, unidades funcionales del pulmón. La primer línea de defensa en los alvéolos son los macrófagos alveolares. Estas células cuentan con una batería de funciones que aseguran una superficie alveolar libre y estéril.

Las partículas ambientales, o la fracción soluble de ellos, y los microbios son fagocitados por los macrófagos alveolares (Kreyling *et. al.*, 1992). Experimentos *in vitro* probaron que la interacción de estas células con distintos contaminantes ambientales particulados o con los elementos solubles de ellas provocan alteraciones en la función normal de las mismas. La exposición de las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar a los contaminantes ambientales particulados (urbanos o industriales) indujeron incrementos en la producción de especies reactivas del oxígeno, apoptosis y caídas en la viabilidad celular (Becker *et. al.*, 1996; Goldsmith *et. al.*, 1998; Holian *et. al.*, 1998; Soukup *et. al.*, 2000; Soukup *et. al.*, 2001). En lo que respecta al efecto de estos contaminantes particulados sobre la función fagocítica de los macrófagos alveolares, los resultados todavía no son concluyentes. En la mayoría de los trabajos se informa una caída en el porcentaje de

fagocitosis de este tipo celular debido a la exposición al material particulado (Becker *et. al.*, 1998; Soukup *et. al.*, 2000).

La exposición al material particulado no afecta de igual manera a toda la población. Por el contrario, existen subpoblaciones de mayor riesgo en las cuales los efectos por la exposición a contaminación ambiental por material particulado son más drásticos. Los infantes, ancianos, fumadores, trabajadores expuestos a materiales tóxicos y personas que padecen enfermedades cardiopulmonares, son grupos de mayor susceptibilidad a la exposición a material particulado (Pope *et. al.*, 1993; Saldiva *et. al.*, 1995). Esta mayor susceptibilidad no sólo se debe a efectos acumulativos provocados por la deposición crónica de partículas en los alvéolos, sino que también se debe a cambios intrínsecos en la funcionalidad de los macrófagos alveolares. De esta manera se explican los efectos agudos ocasionados por la exposición al material particulado.

La edad es uno de los factores de riesgo más reconocidos que determina distintos grados de susceptibilidad a la polución ambiental y a contraer enfermedades cardiorrespiratorias. La base de esta mayor susceptibilidad no es aún conocida. La identificación de las fuentes y características físico-químicas de la polución ambiental en relación a los efectos adversos que produce en la subpoblación de edad avanzada es de gran importancia para la toma de decisiones de política ambiental, de manera de controlar los niveles de los componentes de la polución ambiental que causan particular daño a esta fracción de la población. El fin de toda política de protección ambiental debería ser mantener los niveles de polución lo suficientemente bajos de manera de proteger la salud de todos los grupos susceptibles de la población. Por otra parte, es importante también el estudio de las causas de la mayor susceptibilidad de esta subpoblación a la polución ambiental y de los mecanismos por los cuales el material particulado ejerce sus efectos adversos sobre la salud, con el objeto de delinear tratamientos que tiendan a minimizar los efectos perjudiciales del material particulado (Sandström *et. al.*, 2003).

Es conocido que muchas funciones del sistema monocito-macrófago se modifican con la edad. El envejecimiento del sistema inmunitario se evidencia por una mayor

susceptibilidad de contraer infecciones por patógenos. Esta mayor susceptibilidad fue asociada a una caída general en las funciones de las células T (Pawelec *et. al.*, 1997; Pawelec *et. al.*, 1999). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la función de los macrófagos, en oposición a la función de los linfocitos, no decae con la edad y que por el contrario sus funciones se ven incrementadas (De la Fuente *et. al.*, 2000).

El estado redox celular está determinado por la producción de radicales libres y la existencia de sistemas enzimáticos y moléculas antioxidantes. El balance entre la producción de las especies oxidantes y las especies antioxidantes cambia continuamente en respuesta a señales extracelulares, como ser la unión de un factor de crecimiento a su receptor. Alteraciones en el balance redox celular regulan un gran número de funciones fisiológicas y determinan la supervivencia o muerte celular (Martindale *et. al.*, 2002). Por consiguiente, el estado redox es un punto de regulación importante de las funciones celulares, activación celular e inicio de procesos inflamatorios (Winrow *et. al.*, 1993). Actualmente el modo de acción del material particulado y el daño o los cambios que el mismo produce se explican por la capacidad de varios de sus componentes de generar radicales libres o inducir la producción de los mismos por parte de las células pulmonares (Li *et. al.*, 1996). En consecuencia, cualquier investigación acerca de los efectos del material particulado sobre la función de las células pulmonares debe incluir el estudio de la producción de especies reactivas y la capacidad antioxidante, es decir, el análisis del estado redox celular y la ocurrencia de estrés oxidativo, el desbalance entre la producción de especies reactivas y la presencia de defensas antioxidantes.

El objetivo de este trabajo es determinar cambios que ocurren en función de la edad en células obtenidas por lavado bronqueoalveolar cuando las células son expuestas a contaminantes ambientales particulados. Células obtenidas por lavado bronqueoalveolar de ratas jóvenes (1-2 meses) y adultas (8-9 meses) fueron expuestas a la fracción soluble de la ROFA. Se realizó también un estudio parcial de los efectos de la fracción soluble de un contaminante ambiental particulado recolectado en la Ciudad de Buenos Aires. De esta forma, se busca evaluar el efecto

de este material particulado local en la salud y la calidad ambiental de la Ciudad de Buenos Aires.

Materiales y Métodos

Reactivos

PBS (solución salina de fosfato), Azul de tripán, NBT (nitroblue tetrazolium), TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato), PVP (polivinilpirrolidona), ABAP (2,2-azobis 2-amidinopropano), luminol, Trolox, Hoechst 33258, LPS (lipopolisacárido) bacteriano de *Escherichia coli* 0111:B4 fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Las esferas de látex fluorescentes (2.2 μm) fueron adquiridas en Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EEUU).

Animales

Ratas Wistar machos jóvenes (1-2 meses) y adultas (8-9 meses) fueron provistas por el Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica y mantenidas en condiciones estándares en el bioterio de la misma institución. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

Preparación de la fracción soluble de la ROFA

Las partículas de ROFA, donadas gentilmente por el Dr. John Godleski de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard, EEUU, fueron resuspendidas en PBS a una concentración de 1 mg/ml. La suspensión fue sonicada 10 minutos y centrifugada a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C (Kobzik *et. al.*, 1998). El sobrenadante obtenido se consideró como la fracción soluble de la ROFA (ROFA_{sf}). La ROFA_{sf} se empleó en los distintos experimentos inmediatamente luego de su preparación.

Aislamiento de fagocitos pulmonares

Los animales fueron sacrificados y sus pulmones fueron lavados según Tasat *et. al.* (1987). La tráquea fue canulada y perfundida con 42 ml de PBS (3 ml \times 14 veces). El lavado bronqueoalveolar (BAL) fue centrifugado 10 minutos a $800 \times g$, y el pellet

celular resuspendido en la misma solución buffer. Mediante esta técnica el 90 % de las células presentes son macrófagos alveolares.

Determinación del total de células obtenidas en un lavado bronqueoalveolar

La concentración y el total de células de las suspensiones celulares se determinó mediante el conteo en una cámara de Neubauer. En todos los experimentos la concentración de células se ajustó a 10^6 células/ml.

Exposición a la ROFA_{sf}

Las células del lavado bronqueoalveolar provenientes de ratas jóvenes y adultas, fueron incubadas en suspensión con PBS o con 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml de la fracción soluble de la ROFA. Las incubaciones se realizaron en tubos de polipropileno y los ensayos fueron diseñados de manera de tener una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en cada tubo. Las células fueron incubadas con la ROFA_{sf} durante 2 hs., bajo agitación constante a 37°C.

Ensayo de viabilidad celular

Luego de la incubación de las células con PBS o con la fracción soluble de la ROFA, se tomaron pequeñas alícuotas de cada suspensión para determinar la viabilidad celular. A cada muestra se le agregó un volumen igual de azul de tripán 0,04 % en PBS, se incubaron durante 5 minutos, se contaron y se examinaron bajo un microscopio de contraste de fase invertido. En cada ensayo se contaron al menos 100 células y el porcentaje de células viables se expresó según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de células viables} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células que no internalizaron el azul de tripán}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \times 100$$

Generación de especies reactivas del oxígeno

La generación de especies reactivas del oxígeno en las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar se evaluó por el ensayo del NBT, según el método descrito por Hedly y Currie (1978). Las células del BAL, expuestas o no a la ROFA_{sf}, fueron tratadas con NBT 0.05 % final en PBS. El NBT es soluble en PBS y en presencia de especies reactivas del oxígeno precipita como una sal de formazana azul. El TPA, un conocido inductor de la generación de especies reactivas del oxígeno por activación de la PKC y la NADPH oxidasa, se utilizó como control positivo de la reacción. Las suspensiones celulares fueron incubadas durante 1 h., bajo agitación constante a 37°C. El TPA se agregó a los 15 minutos del inicio de la incubación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las suspensiones celulares fueron fijadas con paraformaldehído 4% final durante 30 minutos, centrifugadas por 10 minutos a 800 × g y resuspendidas en PVP preparado al 10% en agua bidestilada. Se prepararon extendidos sobre portaobjetos cargados positivamente, se fijaron en metanol por 30 minutos a temperatura ambiente y se montaron con glicerina.

Las células con precipitados intracelulares azules debido a la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, se consideraron como células reactivas. El resultado se informó como el porcentaje de células reactivas. Se contaron al menos 100 células por ensayo. La evaluación se realizó bajo un microscopio óptico con una amplificación de 1000×.

Determinación de la capacidad antioxidante total (TRAP)

La capacidad antioxidante total se evaluó mediante la técnica de TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) desarrollada por Lissi (Lissi *et. al.*, 1992). Las células controles o expuestas a distintas concentraciones de la ROFA_{sf} fueron lisadas e incubadas con 20 mM ABAP y 40 μM de luminol. El ABAP es una fuente de radicales libres que reacciona con el luminol generando quimioluminiscencia. Al agregar la muestra, la emisión de luz disminuye hasta niveles basales. El tiempo que tarda en retornar a la emisión original, denominado tiempo de inducción (τ_i), es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra.

El sistema se calibró contra Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E. De esta manera los resultados se expresaron en μM Trolox, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = \text{factor de dilución} \times \frac{\text{tiempo de inducción de la muestra}}{\text{tiempo de inducción de } 1 \mu\text{M Trolox}}$$

Evaluación de la apoptosis

La ocurrencia de apoptosis en células control o incubadas con concentraciones crecientes de ROFA_{sf} se evaluó a nivel morfológico.

Para el análisis morfológico de las muestras se empleó un colorante fluorescente, el Hoechst 33258, que tiene la propiedad de intercalarse en el ADN. Mediante el empleo de este colorante pueden visualizarse alteraciones de la morfología nuclear debido a la apoptosis (Singhal *et. al.*, 1998).

Extendidos celulares realizados a partir de las distintas suspensiones celulares se fijaron durante 30 minutos con metanol-ácido acético (3:1) y se tiñeron con Hoechst 33258 a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente. Como control positivo de apoptosis se incubaron células con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Los extendidos fueron analizados en un microscopio óptico de fluorescencia (Axioplan Microscope, Carl Zeiss, Alemania) a una amplificación de 1000 \times . Se consideraron células apoptóticas a aquellas células con su cromatina compactada y circunscripta a la cara interna de la envoltura nuclear así como a aquellas células que mostraron presencia de invaginaciones y proyecciones a partir de la envoltura nuclear, paso previo a la formación de los cuerpos apoptóticos. Se contaron al menos 100 células por ensayo. Los resultados se informaron como porcentaje de células apoptóticas.

Cuantificación de la actividad fagocítica

El estudio de actividad fagocítica de las células del BAL se llevó a cabo evaluando la habilidad de las células de ingerir esferas de látex (Muller *et. al.*, 1986). Esferas de

látex fluorescentes de 2.2 μm de diámetro fueron opsonizadas con suero fetal bovino, durante 1 h bajo agitación constante a 37°C, y sonicadas antes de su empleo. Las células del lavado bronqueoalveolar fueron incubadas bajo agitación constante a 37°C, durante 3 hs. con la ROFA_{sf}. Luego de las dos primeras horas de incubación, se adicionaron las esferas de látex en una relación esferas/células de 10:1. Para eliminar las esferas de látex libres y aquellas que se adhirieron a la membrana celular pero no fueron fagocitadas, las células se centrifugaron y lavaron con PBS ($\times 3$). Posteriormente, las células fueron fijadas 30 minutos con paraformaldehído 4 %, centrifugadas a 800 $\times g$ y resuspendidas en PVP al 10 % en agua bidestilada. Los extendidos celulares fueron analizados bajo un microscopio óptico de fluorescencia (Axioplan Microscope, Carl Zeiss, Alemania) a 1000 \times . Los resultados de la actividad fagocítica se expresaron como el porcentaje de células que fagocitaron al menos una esfera de látex.

Efecto de la fracción soluble de contaminantes ambientales particulados de Buenos Aires (UAP-BA_{sf})

A fin de estudiar los efectos de contaminantes ambientales particulados locales en la salud, se expusieron células del BAL, provenientes de animales jóvenes y adultos, a la fracción soluble de UAP-BA. Los experimentos se realizaron con una concentración prueba de 10 $\mu\text{g/ml}$ UAP-BA_{sf}, preparada de la misma manera que la ROFA_{sf}. Los parámetros evaluados fueron: generación de especies reactivas del oxígeno, apoptosis y actividad fagocítica, según la metodología expuesta anteriormente.

El material particulado de Buenos Aires fue colectado en el centro de la ciudad (Azcuénaga y M.T. de Alvear) utilizando un equipo MiniVol Portable Sampler (Airmetrics, Eugene, OR, EEUU) a un caudal de 6 lt/h y filtros de teflón (Teflon Gelman TF1000).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. El número de ensayos que se realizó para cada experimento se denota con la letra n y se muestra en la figura correspondiente. El tratamiento estadístico incluyó el empleo del ANOVA (Análisis de varianza) de dos factores, para revelar la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0,05$) debido a la edad, a la fracción soluble de la ROFA (o UAP-BA), o a ambos; y el test de Tukey de comparación de a pares para determinar entre qué pares de ensayos existen diferencias significativas.

Resultados

Citotoxicidad mediada por la fracción soluble de la ROFA.

En orden de determinar la toxicidad de la ROFA_{sf} sobre las células del lavado bronqueoalveolar de animales jóvenes y adultos, se evaluó la viabilidad celular por el test de exclusión de azul de tripán.

La viabilidad celular fue dosis dependiente, siendo mínima para la concentración máxima utilizada (200 µg/ml). A la menor concentración de la ROFA_{sf} utilizada (10 µg/ml) se observó una reducción significativa de un 10-15 % en las dos poblaciones estudiadas. La viabilidad celular disminuye de igual manera en ambas poblaciones celulares pero termina siendo significativamente menor en la población celular proveniente de animales adultos a 200 µg/ml de la ROFA_{sf} (FIG. 1). Sin embargo, es razonable concluir que esas diferencias no son importantes a nivel biológico, y que por lo tanto la ROFA_{sf} es igualmente citotóxica para ambas poblaciones celulares.

Generación de especies reactivas del oxígeno

La generación de especies reactivas del oxígeno fue evaluada por la capacidad de las células de reducir el nitroblue tetrazolium (NBT). Las células que producen ROS reducen a esta droga y provocan la formación de precipitados intracelulares azul-violáceos (FIG. 2).

Los resultados mostraron que la tasa basal de producción de especies reactivas fue significativamente mayor en la población celular proveniente de animales adultos respecto de la tasa hallada para los jóvenes. La producción de especies reactivas se incrementó en ambos casos al incubar las células con concentraciones crecientes de la ROFA_{sf}, y llegó a un plateau que fluctuó alrededor del 60 % (FIG. 3). Las células del BAL provenientes de animales adultos alcanzaron el plateau a 10 µg/ml ROFA_{sf}. Sin embargo, las células provenientes de animales jóvenes debieron ser incubadas con una concentración 5 veces mayor de ROFA_{sf} (50 µg/ml) para alcanzar la misma condición.

Las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar fueron incubadas con TPA como control positivo de la reacción. El TPA indujo un aumento dramático en la producción de especies reactivas en células provenientes de animales jóvenes y adultos alcanzando el porcentaje máximo de células reactivas observadas. La co-incubación de TPA con concentraciones crecientes de ROFA_{sf} no produjo un incremento significativo en la tasa de producción de especies reactivas.

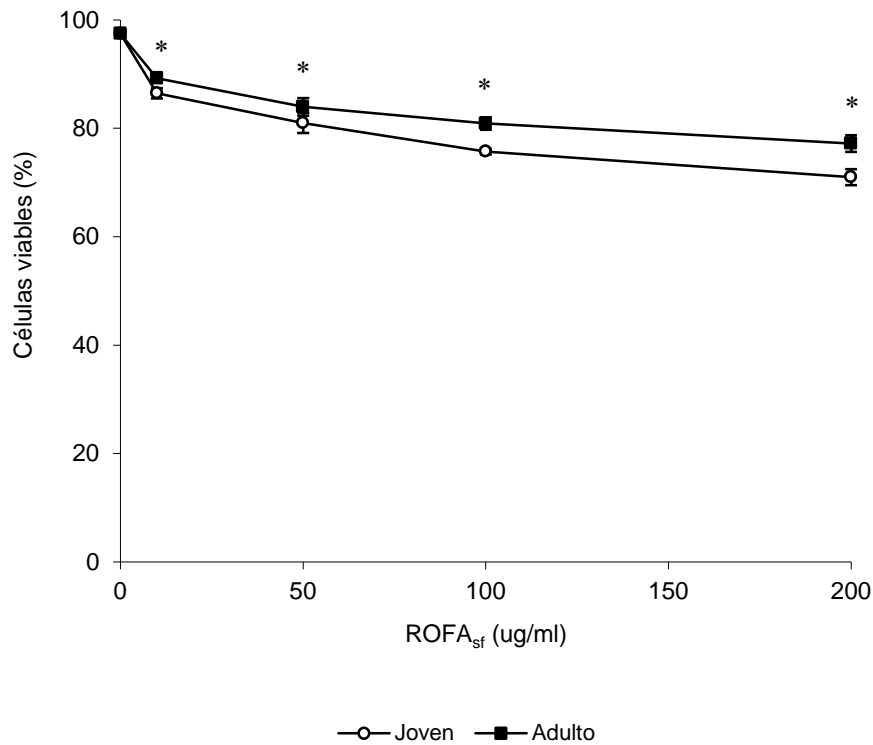


FIG. 1. Efecto de la ROFA_{sf} en la viabilidad de las células del BAL provenientes de animales jóvenes y adultos. Las células del BAL fueron incubadas con concentraciones crecientes de la ROFA_{sf} por 2 hs. a 37°C, como se describió en MyM. La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión del azul de tripán. Los porcentajes representan la media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

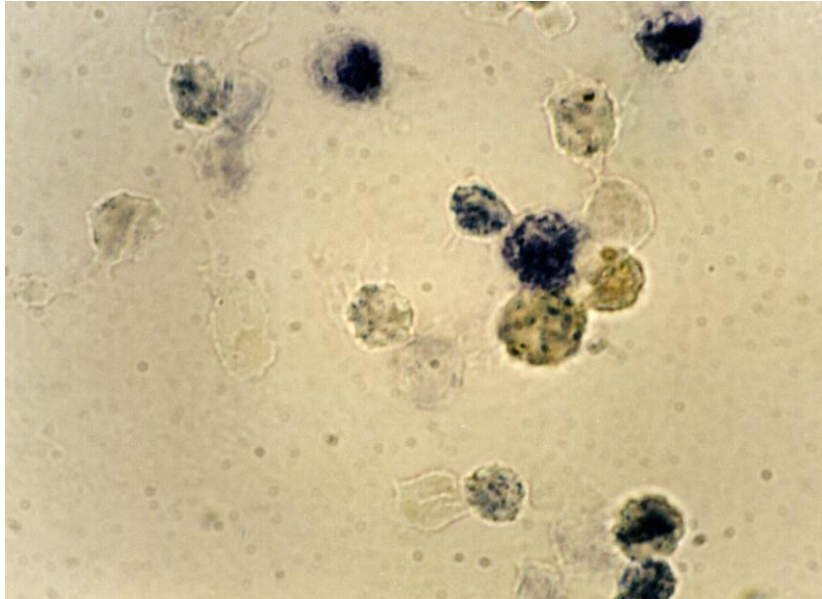


FIG. 2. Células de BAL de animales adultos incubadas con TPA y NBT (1000×). Las células que producen ROS en respuesta a la estimulación del TPA presentan precipitados intracelulares azul-violáceos por la reducción del NBT a sal de formazana.

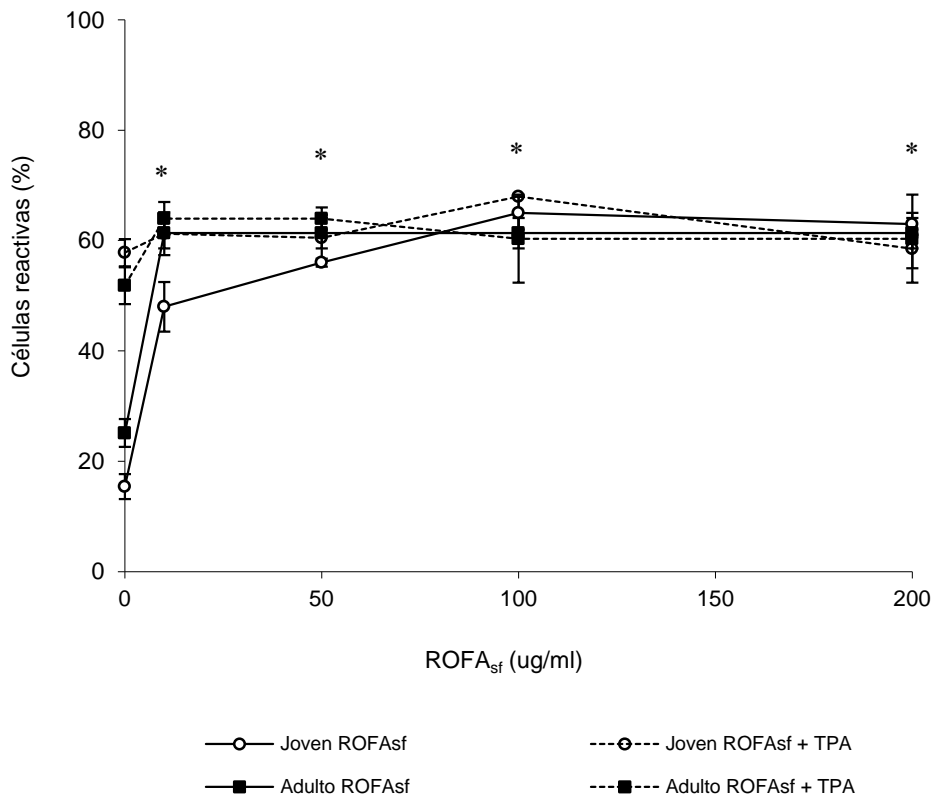


FIG. 3. Efecto de la ROFA_{sf} sobre la producción de especies reactivas del oxígeno en las células del BAL de animales jóvenes y adultos medida por el ensayo del NBT. Las células del BAL fueron incubadas con concentraciones crecientes de la ROFA_{sf} por 2 hs. a 37°C, como se describió en MyM. Los porcentajes representan la media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total fue determinada por el ensayo de TRAP según lo descrito en MyM. La capacidad antioxidante de las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar resultó ser dos veces mayor en la población celular proveniente de animales jóvenes respecto de la capacidad antioxidante correspondiente a animales adultos (FIG. 4). La capacidad antioxidante de las células provenientes de animales jóvenes cayó cerca del 20 % respecto del control luego de la incubación con 200 $\mu\text{g/ml}$ ROFA_{sf}. Por su parte, la capacidad antioxidante de las células obtenidas de animales adultos se mantuvo inalterada luego de la incubación con las distintas concentraciones de la ROFA_{sf}. El hecho de que no disminuya la capacidad antioxidante en este caso puede explicarse si se imagina una situación en la cual la producción de especies reactivas es muy alta y la concentración de antioxidantes no es la suficiente para controlar los efectos de estas especies sobre otras moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ADN).

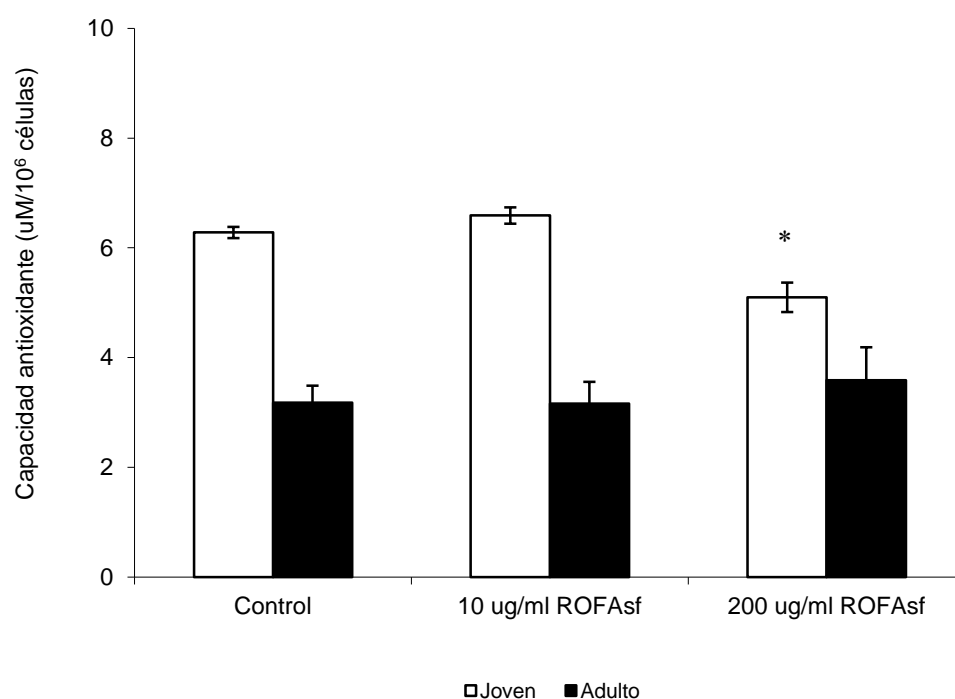


FIG. 4. Capacidad antioxidante total de las células del BAL provenientes de animales jóvenes y adultos luego de la incubación por 2 hs. a 37°C con PBS, 10 µg/ml ROFA_{sf} y 200 µg/ml ROFA_{sf}. La capacidad antioxidante total fue evaluada por el ensayo de TRAP. Los porcentajes representan la media ± error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

Determinación de apoptosis

La apoptosis se evaluó por análisis de la morfología nuclear revelada por el empleo del colorante fluorescente Hoechst 33258, que se intercala en el ADN (FIG. 5).

El porcentaje de células apoptóticas se incrementó significativamente luego de la incubación con 200 µg/ml ROFA_{sf}, en jóvenes y adultos (FIG. 6). En jóvenes el porcentaje alcanzó el $9 \pm 2 \%$ (3 veces superior al control), incluso superando el porcentaje encontrado para la incubación con 10 µg/ml de LPS (control positivo). En adultos el porcentaje alcanzó el $14 \pm 1 \%$ (2,4 veces superior al control), similar porcentaje hallado para el control positivo con LPS. A pesar de estos incrementos en la ocurrencia de apoptosis al exponer las células del BAL a la ROFA_{sf}, los porcentajes encontrados son bastante bajos y seguramente carezcan de importancia a nivel biológico.

Actividad fagocítica de las células del lavado bronqueoalveolar

La actividad fagocítica de las células del BAL, expuestas o no a la ROFA_{sf}, fue evaluada por su habilidad de ingerir esferas de látex fluorescentes de 2.2 µm de diámetro.

La figura 7 muestra el porcentaje de células fagocíticas luego de la incubación con PBS, 10 µg/ml ROFA_{sf} y 200 µg/ml ROFA_{sf}. La actividad fagocítica mostró ser dependiente de la edad. La actividad fagocítica basal fue mayor en las células provenientes de animales adultos ($75 \pm 3 \%$) que en las células provenientes de

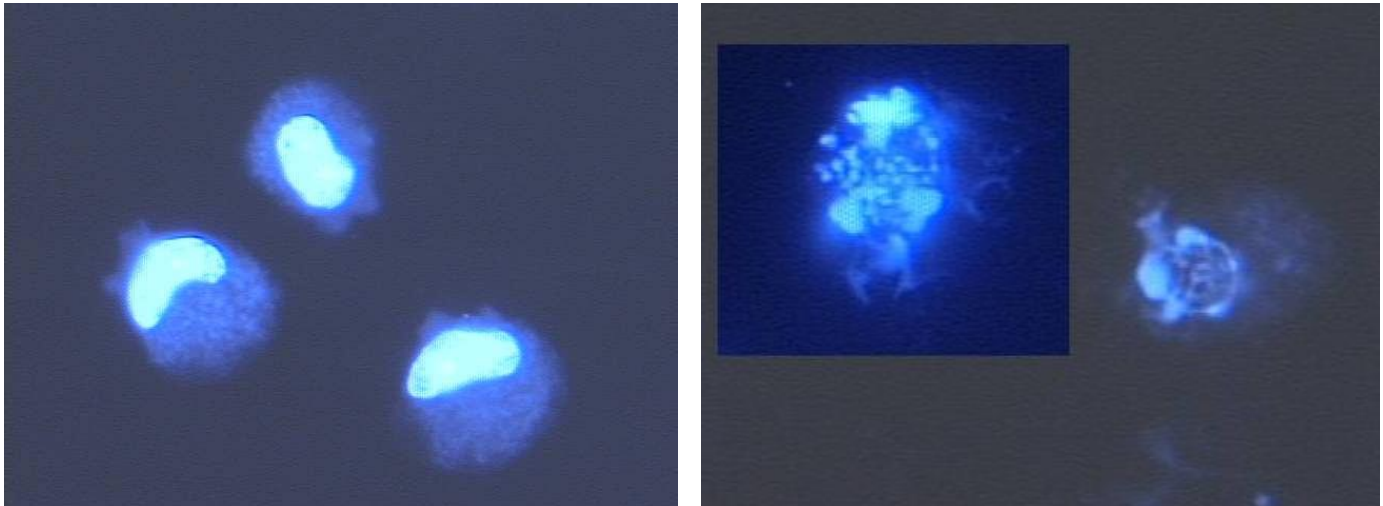


FIG. 5. Células pulmonares obtenidas por lavado bronqueoalveolar de animales adultos, expuestas a la ROFA_{sf} por 2 hs. a 37°C y teñidas con el colorante fluorescente Hoechst 33258 (microscopía de fluorescencia a 1000×). A) Células no apoptóticas. B) Células apoptóticas. La células de la derecha presenta la cromatina compactada en la periferia de la envoltura nuclear. La célula de la izquierda presenta invaginaciones de la envoltura nuclear con formación de cuerpos apoptóticos.

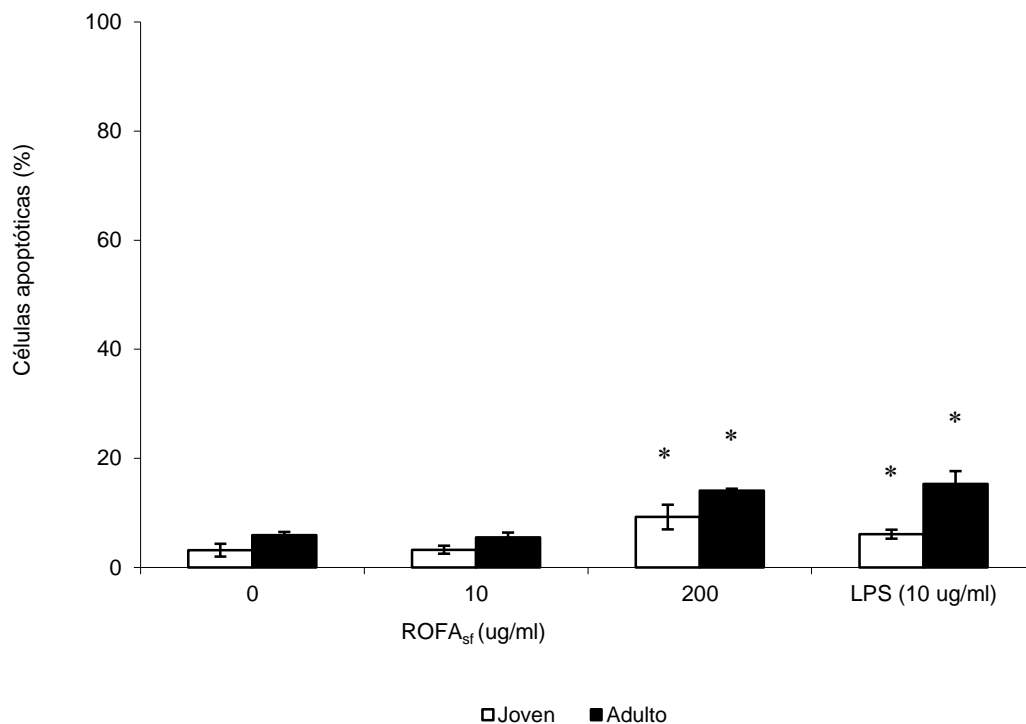


FIG. 6. Índices de apoptosis de células obtenidas por lavado bronqueoalveolar de animales jóvenes y adultos, incubadas con diferentes concentraciones de la ROFA_{sf} por 2 hs. a 37°C. La ocurrencia de apoptosis se determinó morfológicamente teñiendo las células con el colorante fluorescente Hoechst 33258. Los porcentajes representan la media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

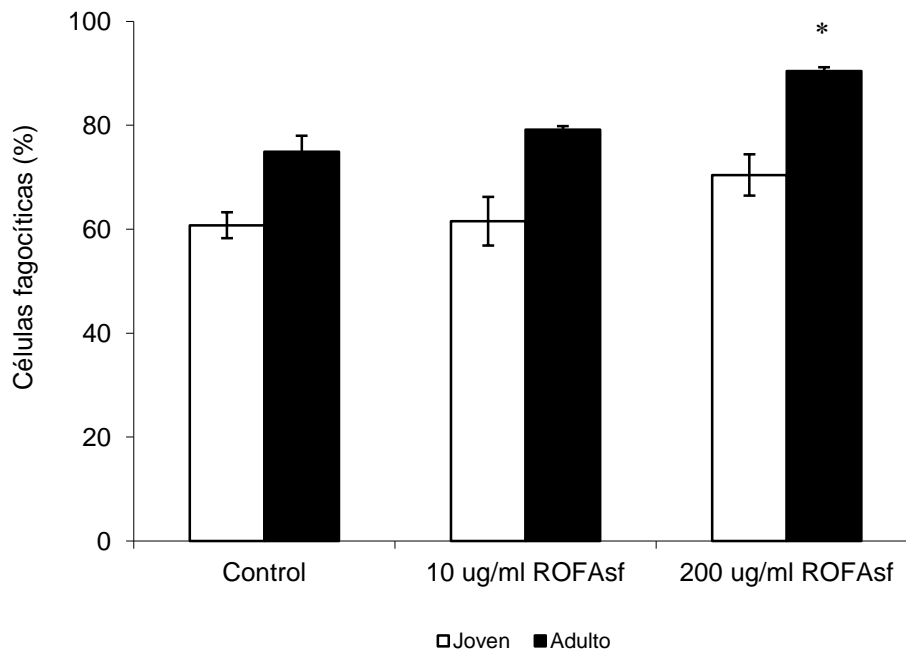


FIG. 7. Efecto de la ROFA_{sf} sobre la actividad fagocítica de las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar de animales jóvenes y adultos. Las células del BAL fueron incubadas con concentraciones crecientes de la ROFA_{sf} por 2 hs. a 37°C. La actividad fagocítica se evaluó por la habilidad de las células en ingerir esferas de látex fluorescentes de 2.2 μm de diámetro. Los porcentajes representan la media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

animales jóvenes (61 ± 3 %). Ambos grupos etarios respondieron de manera diferente a la exposición a la fracción soluble de la ROFA. Mientras que la ROFA_{sf} no afectó la actividad fagocítica de las células provenientes de animales jóvenes a las concentraciones ensayadas, la ROFA_{sf} produjo un incremento del porcentaje de células fagocíticas en las células provenientes de animales adultos (90 ± 1 %) cuando las células fueron incubadas con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ROFA_{sf}. Esto implica un aumento del 20 % respecto de la actividad fagocítica del control.

Efecto de la fracción soluble de contaminantes ambientales particulados de la ciudad de Buenos Aires (UAP-BA_{sf})

Las células del BAL fueron incubadas en suspensión con PBS y 10 µg/ml UAP-BA_{sf} con el objeto de analizar la generación de especies reactivas del oxígeno, apoptosis y actividad fagocítica.

La figura 8 muestra la generación de especies reactivas del oxígeno por las células del BAL medida por el ensayo del NBT. La fracción soluble del contaminante particulado local (UAP-BA) indujo un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno. Una concentración de 10 µg/ml de la UAP-BA_{sf} fue suficiente para inducir el nivel máximo de producción especies reactivas en las células provenientes de animales adultos (55 ± 9 % de células reactivas), al igual que lo hizo la misma concentración de la ROFA_{sf}. La exposición de las células del BAL provenientes de animales jóvenes a 10 µg/ml de la UAP-BA_{sf} produjo un incremento

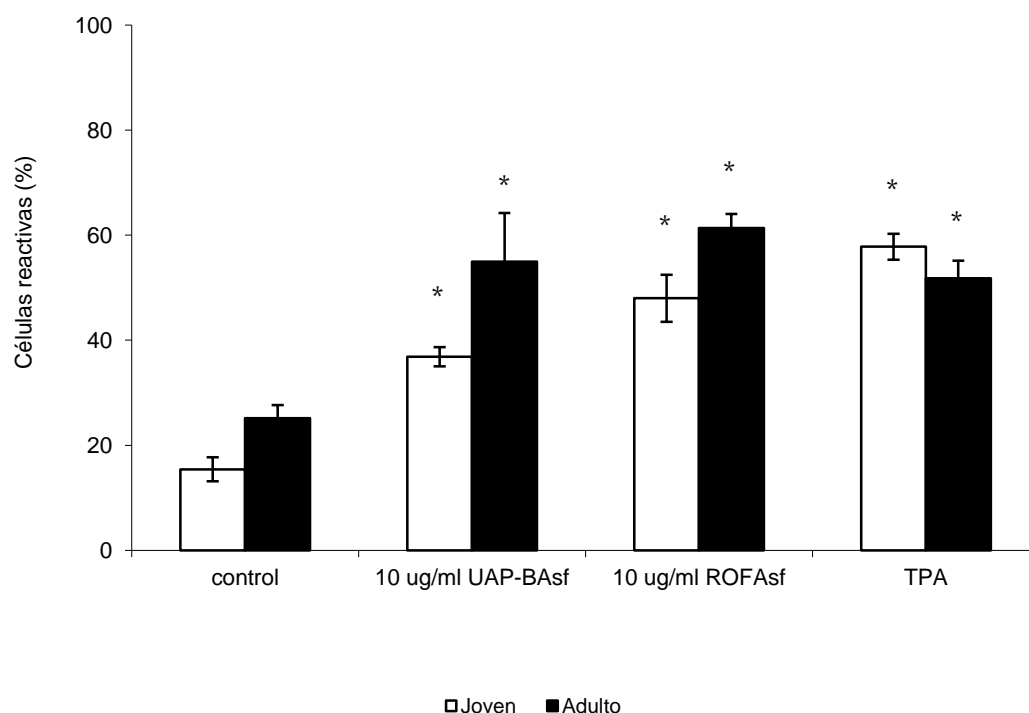


FIG. 8. Producción de especies reactivas del oxígeno por las células del BAL de animales jóvenes y adultos medida por el ensayo del NBT. Las células del BAL fueron incubadas con PBS, 10 µg/ml de ROFA_{sf}, 10 µg/ml de UAP-BA_{sf} y TPA por 2 hs. a 37°C. Los porcentajes representan la media ± error estándar (n = 3 animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas (P < 0.05) respecto del control correspondiente.

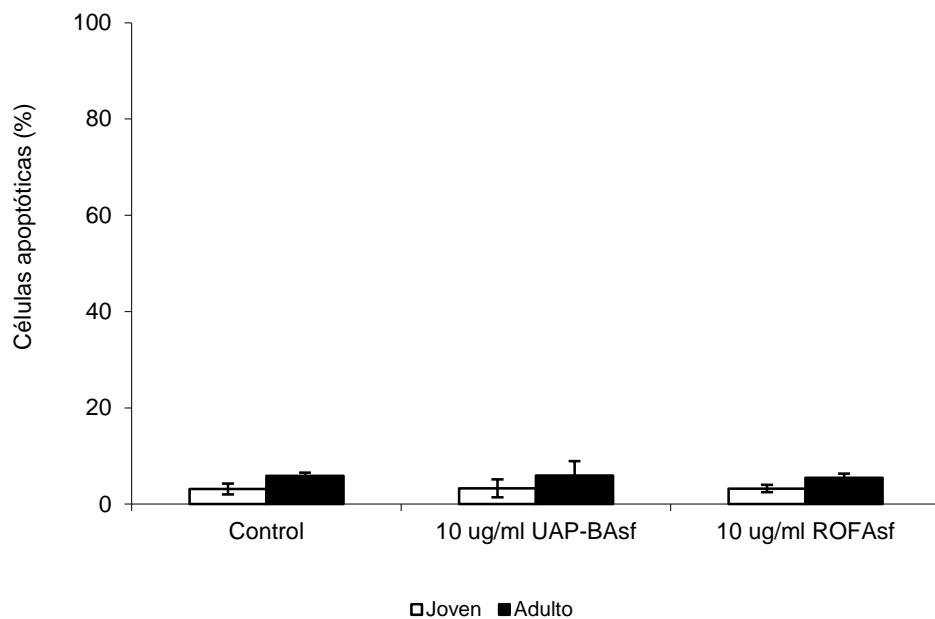


FIG. 9. Indices de apoptosis de células obtenidas por lavado bronqueoalveolar de animales jóvenes y adultos, incubadas con PBS, 10 $\mu\text{g/ml}$ de ROFA_{sf} y 10 $\mu\text{g/ml}$ de UAP-BA_{sf} por 2 hs. a 37°C. La ocurrencia de apoptosis se determinó morfológicamente tiñendo las células con el colorante fluorescente Hoechst 33258. Los porcentajes representan la media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

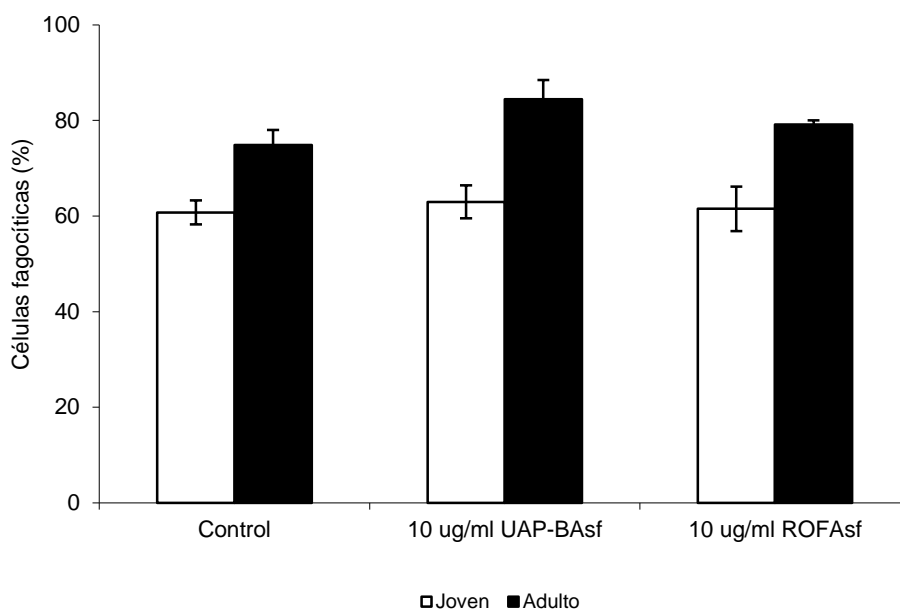


FIG. 10. Efecto de la UAP-BA_{sf} sobre la actividad fagocítica de las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar de animales jóvenes y adultos. Las células del BAL fueron incubadas con PBS, 10 $\mu\text{g/ml}$ de ROFA_{sf} y 10 $\mu\text{g/ml}$ de UAP-BA_{sf} por 2 hs. a 37°C. La actividad fagocítica se evaluó por la habilidad de las células en ingerir esferas de látex fluorescentes de 2.2 μm de diámetro. Los porcentajes representan la

media \pm error estándar ($n = 3$ animales). Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

significativo en la producción de especies reactivas del oxígeno (37 ± 2 % de células reactivas). Los niveles de producción de ROS en este caso fueron menores a los encontrados para el control positivo y $10 \mu\text{g/ml}$ de la ROFA_{sf}.

El estudio de la incidencia de apoptosis en las células del BAL se llevó a cabo por el análisis de la morfología nuclear revelada por el empleo de un colorante fluorescente que se intercala en el ADN, el Hoechst 33258. La incubación con $10 \mu\text{g/ml}$ de la UAP-BA_{sf} no tuvo efectos sobre las tasas de apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas no se vio afectado en las células provenientes de animales jóvenes ni adultos por la incubación con la concentración mencionada de la fracción soluble del contaminante particulado local, tal como ocurrió con la exposición de las células a la misma concentración de la ROFA_{sf} (FIG. 9).

Los efectos de la UAP-BA_{sf} sobre la actividad fagocítica de las células del BAL fueron examinados evaluando la habilidad de estas células de ingerir esferas de látex de $2,2 \mu\text{m}$ de diámetro. El porcentaje de células fagocíticas en las células provenientes de animales jóvenes y adultos no fue significativamente afectado por la incubación con $10 \mu\text{g/ml}$ UAP-BA_{sf} (FIG. 10).

Discusión

La fracción soluble de la ROFA resultó ser citotóxica aún a una exposición breve de 2 hs., registrándose una caída exponencial de la viabilidad en jóvenes y en adultos.

La ROFA es un contaminante ambiental que contiene una alta abundancia de metales de transición, como vanadio, níquel, azufre y hierro. Se ha demostrado que estos metales de transición son responsables en gran medida de la toxicidad de este contaminante ambiental. A su vez, la solubilidad de estos elementos presentes en la ROFA es muy alta (Dreher *et. al.*, 1996 y 1997). Por consiguiente, es muy probable que una gran parte de estos metales estén presentes en la ROFA_{sf} y sean la causa de la citotoxicidad encontrada en las células del lavado bronqueoalveolar.

La caída en la viabilidad por la ROFA_{sf} medida por el test de exclusión del azul de tripán demuestra que la muerte celular ocurre por daño a membrana, lo cual se manifiesta por la acumulación del colorante en el interior de las células. Las especies reactivas del oxígeno podrían ser responsables de este daño celular. La función fisiológica de las especies reactivas del oxígeno es la de eliminar microorganismos que hayan llegado hasta los alveólos pulmonares, así como la de actuar como quimioatrayentes y favorecer el desarrollo de procesos inflamatorios. En el caso de partículas ambientales, las especies reactivas del oxígeno tendrían la función de atraer células fagocíticas para eliminar estas partículas y mantener una superficie alveolar limpia que asegure la función fisiológica del pulmón. Las principales fuentes de especies reactivas en estas células son la NADPH oxidasa de membrana y la cadena de electrones mitocondrial, principalmente en la forma de anion superóxido.

Los resultados indican que la ROFA_{sf} es un fuerte inductor de la producción de especies reactivas del oxígeno. Las células del BAL provenientes de animales adultos son más susceptibles a este contaminante ambiental. A una dada concentración de la ROFA_{sf} y en comparación con las células provenientes de animales jóvenes, las células provenientes de animales adultos reaccionan en forma más intensa. Aparentemente, la producción de especies reactivas es exclusivamente a través de la

activación de NADPH oxidasa. La primera evidencia de ello es el comportamiento exponencial de las curvas y el hecho de que lleguen a un plateau a una cierta concentración del contaminante. Estas características señalan la participación de un mecanismo enzimático de producción de especies reactivas. La segunda evidencia es el hecho de que no se observó sinergismo al incubar las células con TPA y ROFA_{sf}, lo cual señala rutas comunes. En ningún caso el aumento superó el máximo alcanzado, lo que podría señalar un único mecanismo generador de las especies reactivas.

Los efectos mediados por las especies reactivas del oxígeno no pueden explicarse simplemente por sus niveles de producción. El desbalance en el estado redox celular, que ocurre cuando los niveles de las especies reactivas aumentan a tal punto que la capacidad antioxidante celular no alcanza para eliminarlas, es el que produce cambios y alteraciones en la fisiología celular. Esta situación de desbalance, en la cual las especies reactivas superan la capacidad antioxidante, se acumulan y producen daño a moléculas biológicas, muerte celular o cambios en funciones celulares, se denomina *estrés oxidativo*.

Los resultados encontrados en este trabajo indican que las células provenientes de animales jóvenes tienen el doble de la capacidad de los adultos de resistir y controlar incrementos en la producción de especies reactivas del oxígeno, y que por ende van a sufrir menos cambios y alteraciones producidas por la acumulación de estas especies reactivas.

La apoptosis y la capacidad fagocítica de las células del BAL expuestas a la ROFA_{sf} son dos actividades metabólicas importantes que permiten estudiar cambios en la función celular y determinar probables alteraciones en la fisiología pulmonar.

La exposición de las células a la ROFA_{sf} produjo un aumento en la ocurrencia de apoptosis tanto en la población proveniente de animales jóvenes como adultos. Si bien en este modelo experimental la ROFA_{sf} ocasionó daño a membrana, no indujo apoptosis con la misma intensidad. La exposición a la ROFA_{sf} generó un incremento en la actividad fagocítica en las células provenientes de animales adultos.

En conjunto, la ROFA_{sf} exagera e incrementa varias de las posibles actividades y respuestas de un célula fagocítica alveolar (principalmente el macrófago alveolar). La ROFA_{sf} generó un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, incrementos en los índices de necrosis, apoptosis y actividad fagocítica de las células del BAL.

La respuesta a la fracción soluble de la ROFA fue más marcada en las población celular proveniente de animales adultos. El estado redox celular es un regulador interno de varias de las funciones fisiológicas llevadas a cabo por una célula (Nose *et. al.*, 2000). En el sistema experimental utilizado, la producción de ROS en las células control y expuestas a 10 µg/ml ROFA_{sf} fue mayor en adultos que en jóvenes. Este incremento se correspondió con una menor capacidad antioxidante, un mayor índice de apoptosis y actividad fagocítica comparados con los hallados para los jóvenes. Estos resultados demuestran que las células provenientes de animales adultos son activadas más fácilmente debido a una mayor producción de ROS y una menor capacidad antioxidante. La menor capacidad antioxidante de los adultos determina que ante la producción de ROS las células avancen más fácilmente hacia una situación de estrés oxidativo, y se activen en respuesta a ello.

Si tomamos como parámetro del estado redox el cociente entre la producción de ROS medida por reducción del NBT y la capacidad antioxidante total medida por TRAP, observamos que la edad y el material particulado son dos factores que llevan a una mayor producción de ROS y a un estado redox más oxidante (FIG. 11). De aquí se deduce que los ROS y el estado redox celular podrían estar jugando un papel en el desarrollo de una mayor susceptibilidad a contraer infecciones pulmonares. Los ROS son citotóxicos y pueden afectar directamente el tejido pulmonar (Winrow *et. al.*, 1993), lo cual conduciría a un aumento de la permeabilidad capilar y contribuiría a la mayor susceptibilidad de contraer infecciones pulmonares que ocurre con el avance de la edad y con la exposición a contaminantes ambientales particulados.

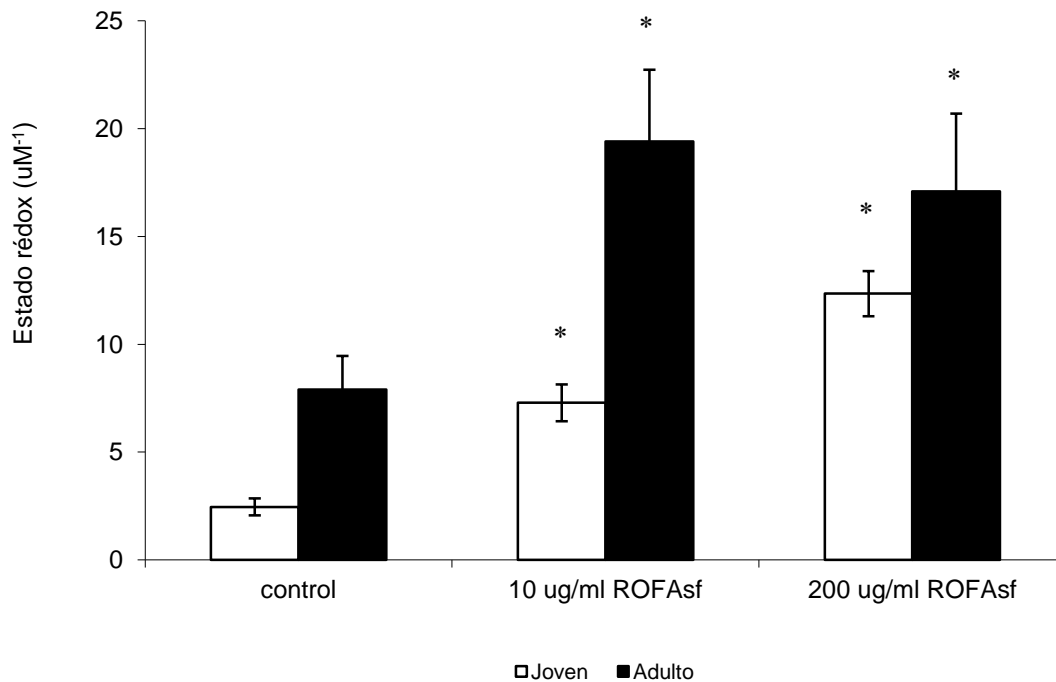


FIG. 11. La edad y el material particulado son dos factores que afectan el estado rédox celular. El estado rédox se define como el cociente entre la producción de especies reactivas medida por el ensayo del NBT, expresado como el porcentaje de células reactivas, y la capacidad antioxidante total medida por el ensayo de TRAP, expresado como equivalentes de Trolox por célula. Los porcentajes representan la media \pm error estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto del control correspondiente.

Es conocido que la actividad del sistema inmune específico decae con la edad. La senescencia del sistema inmune se evidencia por una mayor susceptibilidad a contraer infecciones en los ancianos (Pawelec y Solana *et. al.*, 1997). Sin embargo, la influencia de la edad en los mecanismos de respuesta innata, mediados por células fagocíticas, no es concluyente (Mc Arthur *et. al.*, 1998; De la Fuente *et. al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que la función de los macrófagos, en oposición a la función de los linfocitos, no decae con la edad sino que se observa un incremento en la función del sistema monocito-macrófago (De la Fuente *et. al.*, 2000). Este trabajo apoya la observación de que la función de las células fagocíticas, en este caso pulmonares, se incrementa con la edad.

Los resultados discutidos anteriormente señalan que con el avance de la edad la capacidad antioxidante decae y la producción de ROS aumenta, de manera que el

estado redox celular tiende a ser más oxidante. Este aumento en el estado oxidativo de las células del BAL está asociado con aumentos de los índices de fagocitosis, apoptosis y ROS, trayendo como consecuencia la ocurrencia de procesos inflamatorios en forma más frecuente en animales de mayor edad. De hecho podría pensarse que en animales de edad avanzada ocurren procesos inflamatorios aún en ausencia de estímulo externo debido justamente al estado redox más oxidante que presentan sus células. Estas respuestas inflamatorias en lugar de eliminar a los contaminantes ambientales, se transformarían en perjudiciales alterando la homeostasis y la integridad del tejido pulmonar. Como se mencionó anteriormente, los ROS pueden dañar el tejido pulmonar dando lugar a un edema. Los ROS son factores pro-inflamatorios, actúan como quimioatrayentes de PMNs e inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-8 y TNF- α , a través de la activación de rutas de señalización sensibles al estado redox celular (Allen *et. al.*, 2000; MacNee *et. al.*, 2001). Los ROS y las citoquinas antes mencionadas pueden también inducir la expresión de citoquinas pro-fibróticas (ej. TGF- β) (Driscoll *et. al.*, 1997). De esta manera, un proceso inflamatorio de estas características podría inducir al desarrollo de fibrosis pulmonar y la aparición de enfermedades obstructivas respiratorias en los individuos de edad avanzada. La figura 12 esquematiza y resume el modelo propuesto que explica de qué manera los contaminantes ambientales particulados llevan en última instancia al desarrollo de enfermedades cardiorrespiratorias. Los efectos de la fracción soluble de la ROFA sobre el tejido pulmonar deben corroborarse por correlatos in vivo.

En este trabajo se evaluó el efecto de la UAP-BA_{sf} sobre algunos aspectos de la fisiología celular de las células del BAL provenientes de animales jóvenes y adultos. Esta es la primera vez que se estudian los efectos tóxicos de un contaminante ambiental particulado recolectado en el país.

La concentración elegida de la fracción soluble de este contaminante para los experimentos fue de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ debido que fue la concentración de la ROFA_{sf} a la cual ocurrieron alteraciones en el metabolismo oxidativo de las células y no hubo una reducción importante en el número de células de las poblaciones ensayadas debido

al citotoxicidad del contaminante. La incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de la UAP-BA_{sf}, indujo un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno en las células de ambos grupos etarios, sin afectar los índices de fagocitosis y apoptosis. Los resultados se corresponden en gran medida con los hallados para la misma concentración de la ROFA_{sf}. El efecto de la UAP-BA_{sf} sobre la producción de especies reactivas del oxígeno estaría señalando que la fracción soluble de este contaminante ambiental, por analogía con la ROFA_{sf}, también podría ocasionar daño o alteraciones en la homeostasis pulmonar según se discutió anteriormente.

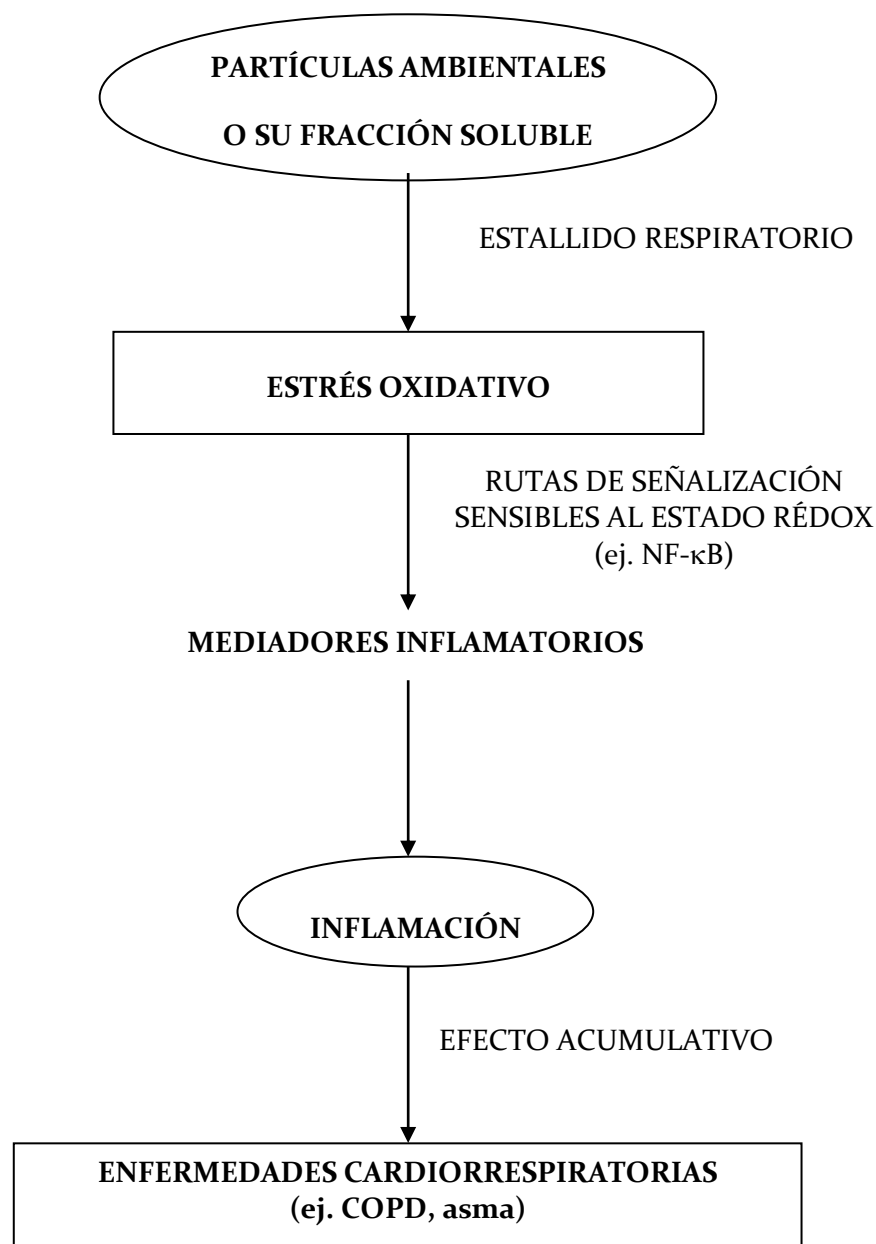


FIG. 12. Modelo por el cual se explica de qué manera los contaminantes ambientales particulados llevan al desarrollo o a una mayor predisposición al desarrollo de enfermedades cardiorrespiratorias. La mayor susceptibilidad de la subpoblación de edad avanzada a contraer estas enfermedades se debe, según el aporte de este trabajo, a una menor capacidad antioxidante de este grupo, lo cual conduciría a una mayor frecuencia en la ocurrencia de episodios de estrés oxidativo, y por consiguiente de procesos inflamatorios. El daño o la alteración sobre el tejido pulmonar que producen estos procesos inflamatorios continuados traería como consecuencia el desarrollo de enfermedades cardiorrespiratorias.

Conclusión

La exposición de las células pulmonares obtenidas por lavado bronqueoalveolar a la fracción soluble de la ROFA produjo incrementos en la producción de especies reactivas del oxígeno, caídas en la capacidad antioxidante total y aumentos en los índices de necrosis, apoptosis y fagocitosis. Por su parte, la UAP-BA_{sf} produjo un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno a la concentración prueba utilizada.

El hecho de que la ROFA_{sf} y UAP-BA_{sf} hayan causado las alteraciones o cambios considerados indica que aún cuando estos contaminantes ambientales particulados no puedan llegar hasta el alveólo, la fracción soluble de ellos puede hacerlo y puede producir varias de las alteraciones analizadas en este trabajo.

La respuesta a contaminantes ambientales particulados es dependiente de la edad. Las células obtenidas por lavado bronqueoalveolar, principalmente macrófagos alveolares, responden diferencialmente a la exposición a la fracción soluble de estos contaminantes ambientales, siendo las células provenientes de los animales de mayor edad las que responden más intensamente a tal exposición.

Se produce un acentuamiento del estado oxidativo de las células pulmonares con el avance de la edad, y es probable que este aumento en el estado oxidativo sea el responsable de la mayor susceptibilidad a contraer enfermedades cardiorrespiratorias en la subpoblación o grupo de edad avanzada.

En consecuencia, es imprescindible estudiar el efecto de los contaminantes ambientales particulados sobre los distintos grupos etarios si el objetivo es proteger a toda la población de los efectos adversos que los mismos ejercen sobre ella. La misma reflexión se extiende a los demás factores que determinan distintos grados de susceptibilidad a la polución ambiental, como el sexo, fumadores, personas con enfermedades cardiorrespiratorias preexistentes, etc.

Referencias

- Allen, R.G. and Tresini, M., Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, **28**(3): 463-499.
- Becker, S., Soukup, J.M., Gilmour, M.I. and Devlin, R.B., Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, **141**: 637-648.
- Becker, S., Soukup, J.M., Decreased CD11B expression, phagocytosis, and oxidative burst in urban particulate pollution-exposed human monocytes and alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1998, **55**: 455-477.
- Dreher, K.L., Jaskot, R.H., Kodavanti, U., Lehmann, J., Winsett, D. and Costa, D., Soluble transition metals mediate the acute pulmonary injury and airway hyperreactivity induced by residual oil fly ash. *Chest.* 1996, **109S**: 33S-34S.
- Dreher, K.L., Jaskot, R.H., Lehmann, J.R., Richards, J.H. and McGee, J.K., Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1997, **50**: 285-305.
- Driscoll, K.E., Carter, J.M., Hassenbein, D.G., Howard, B., Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environmental Health Perspectives.* 1997, **105**(5): 1159-1164.
- Goldsmith, C.W., Imrich, A., Danaee, H., Ning, Y. and Kobzik, L., Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1998, **54**: 529-545.
- Hedley, D.W. and Currie, G.A., Monocytes and macrophages in malignant melanoma. III. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes. *Br. J. Cancer.* 1978, **37**: 347.
- Holian, A., Hamilton, R.F., Morandi, M.T., Brown, S.D., Li, L., Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environmental Health Perspectives.* 1998, **106**(3): 127-132.
- Kreyling, W.G., Intracellular particle resolution in alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 1992, **97**: 121-126.
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K. and MacNee, W., Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀) in vivo and in vitro. *Thorax.* 1996, **51**:1216-1222.
- Lioy, P.J. and Daisey, J.M., Airborne toxic elements and organic substances. *Environ. Sci. Technol.* 1986, **20**: 8-14.

- Lissi, E., Pascual, C. and Del Castillo, M., Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-amidinopropane termolysis. *Free Rad. Res. Commun.* 1992, **17**: 299-312.
- MacNee, W. and Rahman, I., Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?. *Trends Mol. Med.* 2001, **7**: 55-62.
- Martin, T.R., Ruzinski, J.T., Wilson, C.B. and Skerrett, S.J., Effects of endotoxin in the lungs of neonatal rats: age-dependent impairment of the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 1995, **171**: 134-144.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., Cellular response to oxidative stress : signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 2002, **192** : 1-15.
- May, W.E., Benner, B.A., Wise, S.A., Schuetzle, D. and Lewtas, J., Standard reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. *Mutat. Res.* 1992, **276**: 11-22.
- Molinari, B., Tasat, D.R., Fernández, M.L., Duran, H.A., Curiale, J., Stoliar, A. and Cabrini, R.L., Automated image analysis for monitoring oxidative burst in macrophages. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2000, **22**: 423-427.
- Muller, C.D. and Schuber, F., Fluorometric determination of polystyrene latex: application to the measurement of phagosomes and phagocytosis. *Anal. Biochem.* 1986, **152**: 167-171.
- Ortega, E., García, J.J., De la Fuente, M. Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp. Physiol.* 2000, **85**(5): 519-525.
- Parod, R.J. and Brain, J.D., Uptake of latex particles by macrophages: characterization using flow cytometry. *Am. J. Physiol.* 1983, **245**: 220-226.
- Parod, R.J. and Brain, J.D., Immune opsonin-independent phagocytosis by pulmonary macrophages. *J. Immunol.* 1986, **136**:2041-2047.
- Pawelec, G., Solana, R., Immunosenescence. *Immunology Today.* 1997, **18**: 514-516.
- Pawelec, G., Efros, C., Caruso, C., Remarque, E., Barnett, Y., Solana, R., T cells and aging. *Frontiers in Bioscience.* 1999, **4**: 216-269.
- Pope, C.A.R., Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Dockery, D.W., Evans, J.S., Speizer, F.E. and Heath, C.W., Particulate air pollution as a predictor of mortality in prospective study of U. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, **151**: 669-674.

Saldiva, P.H.N., Pope, C.A., Schwartz, J., Dockery, D.W., Lichtenfels, A.J.F.C., Salge, J.M., Barone, I.A., Bohm, G.M. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health*. 1995, **50**(2): 159-163.

Sandström, T., Frew, A.J., Svartengren, M. and Viegi, G., The need for a focus on air pollution research in the elderly. *Eur. Respir. J.* 2003, **21**(40): 928-958.

Schwartz, J. and Dockery, D.W., Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992, **145**: 600-604.

Sen, C.K. and Packer, L., Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996, **10**: 709-720.

Singhal, P.C., Sharma, P., Kapasi, A.A., Reddy, K., Franki, N., Gibbons, N., Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 1998, **160**: 1886-1893.

Sioutas, C. and Kobzik, L., Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ. Health Perspect.* 1997, **105**(5): 1191-1195.

Soukup, J.M., Ghio, A.J. and Becker, S., Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro. *Inhal. Toxicol.* 2000, **12**: 401-414.

Soukup, J.M., Becker, S., Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 2001, **171**: 20-26.

Tasat, D.R., Mancuso, R., O'Connor, S. and Molinari, B., Maturation functional differences in phagocytic activity, superoxide anion and nitric oxide production in rat alveolar macrophages. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2001, **163**: A792.

Thurston, G.D., Ito, K., Kinney, P.L. and Lippmann, M., A multi year study of air pollution and respiratory hospital admissions in three New York State metropolitan areas: Results for 1988 and 1989 summers. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.* 1992, **2**: 429-450.

Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J. and Blake, D.R., Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Brit. Med. Bullet.* 1993, **49**(3): 506-522.