

11261

les
7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES
TABACO ANTITABACO EN PACIENTES CON ENFERMEDADES
PULMONARES**

T E S I S

Que para obtener el Título de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS,
Area de Inmunología
p r e s e n t a

Médico Cirujano MORENO GARCIA MARIA ALBJANDRA



FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen -----	1
Introducción -----	2
Planteamiento del problema -----	13
Hipótesis -----	14
Material y Métodos -----	15
Resultados -----	33
a) Tablas -----	40
b) Figuras -----	47
Discusión -----	55
Conclusiones -----	68
Bibliografía -----	70

ABREVIATURAS

Ac	-Anticuerpo
A.C.F.	-Adyuvante completo de Freund
A.I.F.	-Adyuvante incompleto de Freund
Ag	-Antígeno
ASB	-Albúmina sérica bovina
CH	-Condensado de Humo
CIEF	-Contrainmunolectroforesis
ES	-Extracto Salino
IDR	-Inmunodifusión radial
IEF	-Inmunolectroforesis
Ig	-Inmunoglobulinas
G-P 18	-Glicoproteína de 18 KD
Kd	-Kilo Daltons
LB	-Linfocito B
LT	-Linfocito T
MID	-Microdoble inmunodifusión
EGPA	-Electroforesis en gel de poliacrilamida
PEG 6000	-Poliétilen glicol (peso molecular 6000)
PM	-Peso molecular
rpm	-Revoluciones por minuto
SSP-AZ	-Solución de salina-fosfato con azida de sodio
TEMED	-Tetrametil-etilendiamina

R E S U M E N

El tabaquismo es una enfermedad que afecta a la sociedad. Este hábito provoca el desarrollo de diversas enfermedades - cardiopulmonares.

Se obtuvieron anticuerpos antitabaco producidas en conejos y se formaron complejos inmunes tabaco-antitabaco in vitro. Se demostró la presencia de dichos inmunoreactantes usando técnicas inmunoserológicas y por electroforesis en gel de poliacrilamida. El número de sistemas antígeno-anticuerpo fue de 1 a 4.

En el suero de 46 sujetos normales, fumadores y no fumadores, se demostró la presencia de anticuerpos antitabaco en el 43% de fumadores y en el 71% de no fumadores; en los sueros de los individuos estudiados se evidenciaron antígenos de tabaco por técnicas inmunológicas. El número de bandas en geles de acrilamida fueron de 2 a 9 en ambos grupos.

En el suero de 56 pacientes con neumopatía, fumadores y no fumadores, se demostró la presencia de anticuerpos antitabaco en el 100% de los casos. En el 44% de los fumadores se demostró el antígeno y en el 41% de los no fumadores. En ambos grupos el número de bandas en acrilamida fueron de 2 hasta 6.

No se encontró antígeno del tabaco libre en los sueros de sujetos sanos no fumadores ni tampoco en los fumadores.

La concentración de IgA en los complejos inmunes de pacientes con enfermedad pulmonar fue mayor que en individuos sanos, independientemente de si eran o no fumadores.

I N T R O D U C C I O N

T A B A Q U I S M O

El tabaquismo se debe a la inhalación del humo producido al quemar la planta del tabaco (Nicotina tabacum) que es originaria de América y pertenece al orden de las solanáceas. Las sustancias producidas en la combustión de la hoja de tabaco nocivas para el organismo son el alquitrán, el monóxido de carbono (5%) y la nicotina (0.006-2 mg) entre otras. El alquitrán contiene polonio (0.03-1.0 pCi;) y níquel (3 mg) elementos relacionados con la patogénesis del cáncer broncogénico, y el benzo(a)pireno (10-50 mg) que es un potente carcinógeno (Tabla A). La mayoría de los componentes carcinogénicos que contiene el alquitrán del humo del cigarrillo no están presentes en la hoja del tabaco antes de su procesamiento, sino que se forman durante la combustión. Como cualquier otro proceso de combustión en la del tabaco pueden distinguirse fisicoquímicamente tres zonas principales: la zona carbonosa que es la formación en carbón (600°C) de los compuestos orgánicos de la hoja (proteínas, celulosa, etc.); la zona de incandescencia que es donde se produce la combustión de la zona carbonosa con el oxígeno (800°C), el carbón se oxida en esta región transformándose en dióxido de carbono, y en monóxido de carbono en la parte con oxigenación más deficiente (107); la zona de ceniza que es cuando la oxidación ha sido completa, queda como residuo una ceniza formada por sales minerales de color claro.

El humo del tabaco es un aerosol que contiene millones de partículas cuyos tamaños oscilan entre 0.1 y 1 μ . El fumador

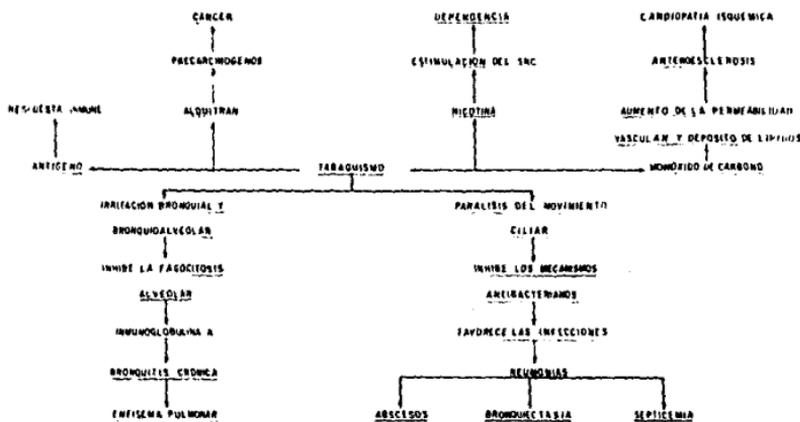
Tabla A.- CONSTITUYENTES DEL HUMO DEL TABACO

AGUA	FENOL
ALCALOIDES, NICOTINA	ORTOCRESOL
ALQUITRANES	META Y PARACRESOL
ISOPROPENO	CATECOL
ACETALDEHIDO	ACIDOS DEBILES
ACROLEINA	ACIDO PALMITICO
FORMALDEHIDO	ACIDO OLEICO
CIANURO DE HIDROGENO	ACIDO LINOLEICO
OXIDO DE NITROGENO	ACIDO ESTEARICO
MONOXIDO DE CARBONO	ACIDO LINOLENICO
DIOXIDO DE CARBONO	INDOL
OXIDO NITRICO	ESCATOL
SULFURO DE HIDROGENO	FENANTRENO
SULFURO DE CARBONILO	BENZO (A) ANTRACENO
ANHIDRIDO SULFUROSO	BENZO (A) PIRENO
SULFURO DE CARBONO	GLICEROL
TIOFENO	CANNABINOIDES
SULFURO DE DIMETILO	NIQUEL
DISULFURO DE METILO	CADMIO
MEZCLA DE ORGANUSULFURADOS	POLONIO
ACETONA	COBRE
NEOFITADIENO	ZINC
PLOMO	MERCURIO
	ESTAÑO

aspira el humo del tabaco, con las sustancias químicas contenidas en la hoja que son las precursoras y condicionantes de los compuestos que aparecen en el humo durante la combustión. El fumador retiene entre el 80 a 90% de las partículas contenidas en el humo cuando la inhalación es sostenida por 2 a 5 segundos; las partículas del humo penetran en las vías respiratorias y se depositan en la superficie de los bronquiolos del parénquima pulmonar. El humo del cigarrillo es una mezcla de gases, vapores no condensados, y partículas. La cantidad de alquitrán que se produce en el humo de un cigarrillo es de 0.3 a 40 mg., dependiendo del tamaño del mismo, longitud, porosidad del papel con que está hecho y uso de filtro (9). Además existe una destilación seca, que se caracteriza por el desprendimiento de los gases de los hidrocarburos, amoníaco, aldehídos, nicotina, vapor de agua y otros productos volátiles (107).

El daño provocado por el tabaquismo no se manifiesta de inmediato, generalmente pasan algunos años entre el momento en que se inició el hábito de fumar y la aparición de los primeros síntomas de las enfermedades como el cáncer de pulmón, de labios ó faringe, infarto del miocardio, arteroesclerosis, enfisema pulmonar, bronquitis crónica, trastornos digestivos gastritis y úlcera gástrica, entre otros (9) (Figura 1). El tabaquismo en mujeres embarazadas puede alterar el desarrollo normal del producto (56).

Figura 1 CAMBIOS IMMUNOPATOLÓGICOS MAS FRECUENTES LIGADOS AL TABAQUISMO



De los resultados experimentales y de estudios clínicos se proponen las siguientes causas como probables de la patología producida por el humo del tabaco (75):

- 1.- Hipersensibilidad
- 2.- Irritación inespecífica
- 3.- Toxicidad farmacológica

Desde hace varias décadas se ha asociado la enfermedad pulmonar (bronquitis y enfisema) con el hábito del tabaquismo, y existen evidencias de que se puede inducir una respuesta inmune humoral y celular contra algún o algunos de los componentes del tabaco en los individuos fumadores (74,64).

Los mecanismos patogénicos de las bronquitis por el tabaquismo se desconocen, y se han observado alteraciones morfológicas y fisiológicas en el pulmón, causadas por el humo del tabaco (35). Por ello se ha tratado de asociar el tabaquismo con la bronquitis crónica y la facilitación de las infecciones bacterianas, sugiriéndose que el humo del tabaco contiene sustancias capaces de inhibir los mecanismos antibacterianos en el aparato respiratorio en la movilidad de los cilios, la secreción del moco, la tos a nivel mecánico, y la estimulación inespecífica de las células linfoides entre otras y actuando sobre los macrófagos alveolares, inhibiendo la actividad fagocítica, la adhesividad a superficie y, posiblemente, modificando el papel inmunoregulador de los macrófagos (58).

En sujetos fumadores se ha observado una falla en los mecanismos de defensa lo cual propicia las infecciones respirato

rias, por las siguientes alteraciones:

- 1.- parálisis del movimiento ciliar, provocado por los compuestos presentes en el humo inhalado (3).
- 2.- en lavados bronquiales se ha observado que las células totales aumentan, pero el porcentaje de linfocitos disminuye (12).
- 3.- la IgG aumenta en las secreciones bronquiales y en el suero, y las inmunoglobulinas se pueden alterar por una modificación en la glicosilación de las mismas (83).
- 4.- la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares se encuentra disminuída.(38)

Es posible que todas estas modificaciones sean debidas al efecto tóxico de los múltiples componentes del humo del tabaco, y desde luego a su acción farmacológica; pero la respuesta inmune hacia el tabaco participa también en las lesiones que se forman en las vías respiratorias. (12)

A nivel bronquial y parenquimatoso se han observado alteraciones morfológicas en la enfermedad pulmonar obstructiva -- crónica (EPOC) de fumadores, debidas a que:

- a) en los lavados broncoalveolares de los fumadores hay mayor cantidad de macrófagos y células polimorfonucleares con una elevación de elastasa y colagenasa y de otras enzimas lisosomales. (25)

- b) la actividad de antiproteasas, específicamente la alfa 1-antitripsina, se encuentra inhibida por radicales superóxidos que se liberan en la combustión del tabaco y que son inhalados, o por componentes del tabaco como el cadmio; cabe señalar que los radicales superóxido además de inactivar a la alfa 1-antitripsina, producen una lesión celular directa sobre las membranas celulares (92).
- c) la inhibición de la antiproteasa condiciona una mayor acción de las elastasas sobre la elastina, y probablemente sobre los proteoglicanos y la fibronectina, favoreciendo el desarrollo del efisema (12,103).
- d) hay una mayor permeabilidad del epitelio alveolar, lo que facilita el paso de bacterias y virus, así como de otras células inflamatorias, o de sus productos metabólicos que llegan al intersticio lesionándolo. (12)
- e) está inhibida la síntesis de proteínas y colágena lo que modifica los procesos normales de reparación (12).

EL EFECTO DE LOS PRODUCTOS DEL TABACO SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Estudios realizados por diversos investigadores han demostrado la capacidad inmunogénica del tabaco. Harkavy (50,36) demostró que los extractos de tabaco inyectados intraperitonealmente a ratas, "sensibilizaron" los tejidos de los animales y por lo tanto los extractos fueron capaces de inducir una res-

puesta inmune antitabaco.

Posteriormente Chu y colaboradores (17) verificaron que algunos componentes presentes en el extracto de tabaco de cigarrillos también eran inmunogénicos para los conejos.

Recientemente se ha comprobado que los extractos de hojas, el humo y el condensado de humo del tabaco tienen sustancias capaces de inducir una respuesta inmune humoral (5,53,33). Además, se ha purificado una glicoproteína, con un peso molecular de 18 Kd (GP-18) que contiene 0.3% de Fe⁺⁺; también se han aislado sustancias semejantes a la quercetina (5,6), las cuales son capaces de inducir una respuesta inmune humoral. El corazón se considera como un órgano blanco de la anafilaxia y se puede producir "choque anafiláctico" en el corazón de conejos y los pulmones de cobayos inyectados con la glicoproteína (54), esta induce anticuerpos antitabaco de clase IgE, así mismo se han demostrado anticuerpos de clase IgG contra la GP-18 en el suero de conejos. (53)

Se han determinado anticuerpos antitabaco en el suero de fumadores, encontrándose una positividad del 11.3%; en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria y que son fumadores, la positividad fue de 26%. No se demostraron anticuerpos antitabaco en los sujetos no fumadores por la técnica de inmunodifusión doble (77,78, 79) y se concluye que la formación de los anticuerpos contra los antígenos del tabaco pueden ser el resultado de una reacción de hipersensibilidad, estos anticuerpos espe

cíficos estaban presentes sólo en algunos fumadores crónicos y con alto grado de tabaquismo, pero se detectaron en el suero de otros individuos. Se propone la posibilidad de que en individuos predispuestos puedan formarse complejos inmunes de anticuerpos y antígenos del tabaco. Estos complejos inmunes podrían ser responsables de algunos de los trastornos cardiovasculares observados frecuentemente en fumadores (78).

Por otro lado, en pacientes fumadores con infarto agudo del miocardio se encontraron anticuerpos antitabaco en el 94.7%. La diferencia de porcentaje de positividad entre el reporte de Romanski y colaboradores (77, 78 y 79) y el de Morales (68) y el de Preciado (75) radica posiblemente en que en los primeros se uso inmunodifusión doble y en los dos últimos con trainmunoelectroforé^{sis}, que tienen una mayor sensibilidad (91).

En el estudio de Morales (68) los individuos donadores de sangre y los pacientes con infarto agudo del miocardio no fumadores presentaron anticuerpos antitabaco en el 80 y 100% de los casos respectivamente; así mismo en el estudio de Preciado (75) el porcentaje de positividad de anticuerpos antitabaco en sujetos sanos fumadores y no fumadores ó con infarto agudo del miocardio no tuvo diferencia significativa.

Estudiando el efecto de la respuesta inmune celular contra el tabaco en 80 sujetos aparentemente sanos, 35 de ellos

no fumadores y 45 fumadores todos produjeron el factor inhibidor de la migración de leucocitos, utilizando un extracto de tabaco como antígeno. Se encontró que tanto los fumadores como los no fumadores tenían un nivel similar de síntesis del factor inhibidor de la migración de leucocitos (FIL) y se concluyó que el inmunógeno contenido en el humo del tabaco es capaz de sensibilizar pasivamente a un alto porcentaje de la población, aunque esta no fume activamente (8). Otra posibilidad es que los productos tóxicos del tabaco lesionen a los linfocitos y por ello se libere el MIF.

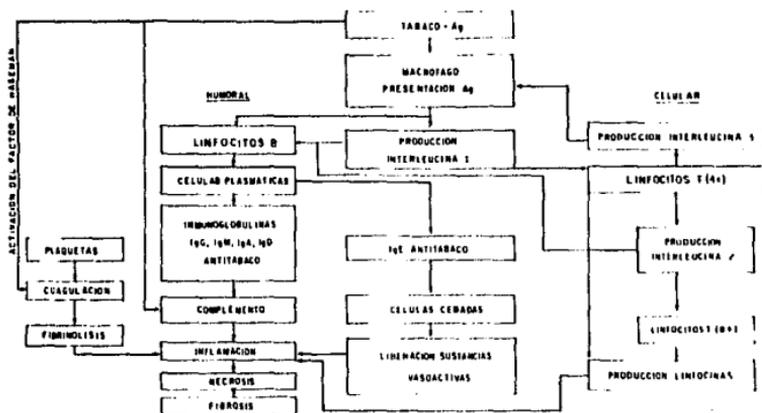
Con los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra diferentes subpoblaciones de linfocitos T, OKT3, OKT4, OKT6, y OKT8, se encontró que la relación de linfocitos OKT4/OKT8, estaba disminuida en los fumadores comparativamente con los no fumadores o fumadores moderados. La disminución de la población de linfocitos OKT4, que corresponden a los linfocitos inductores y/o cooperadores, y el incremento de los OKT8 que son cito tóxicos y/o supresores dan por resultado una depresión de la respuesta inmune (31).

La GP-18 también tiene efecto sobre el complemento, ya que activa al tercer componente del complemento (48).

Se sabe que el antígeno(s) del tabaco está en relación con los sistemas de amplificación del proceso inflamatorio, ya que puede activar la coagulación a través de la modificación del factor de Hageman y este tiene relación con los productos ac-

tivos del sistema inmune y del sistema del complemento (6).
Los mecanismos propuestos en la interacción del tabaco con la
respuesta inmune y los sistemas de amplificación inflamatoria
se resumen en la Figura 2.

Figura 2: TABAQUISMO Y SU RELACION CON LA RESPUESTA INMUNE



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En vista de que el tabaco contiene compuestos capaces de inducir una respuesta inmune humoral se propone que los individuos fumadores tienen complejos inmunes circulantes formados por antígenos del tabaco y anticuerpos, y estos participan en la patogenia de los trastornos pulmonares observados. El objetivo de este trabajo es caracterizar y evaluar la presencia de complejos inmunes en el suero de pacientes con enfermedad pulmonar, con y sin tabaquismo; y establecer la presencia del antígeno(s) del tabaco y de los anticuerpos correspondientes en dichos complejos.

Para cumplir el objetivo de esta tesis primero se demostrará la formación in vitro de complejos inmunes tabaco-anti-tabaco, con anticuerpos producidos en conejos, esto permitirá conocer las características de los complejos inmunes tabaco-antitabaco y permitirá tener un patrón de referencia para comparar los complejos inmunes formados in vivo en sujetos sanos y enfermos, fumadores y no fumadores.

Se determinarán los complejos inmunes en los sueros de pacientes con enfermedad pulmonar precipitándolos con PEG 6000 y se evaluarán por medio de técnicas inmunoserológicas y electrofóresis en geles de poliacrilamida, y se establecerá si contienen inmunoglobulinas y sustancias provenientes del tabaco.

Se realizará un análisis comparativo de los constituyentes de los complejos inmunes tabaco-antitabaco en personas sanas fumadoras y no fumadoras, y en individuos con otras enfermedades.

H I P O T E S I S

Si el humo tiene compuestos inmunogénicos provocará la inducción de anticuerpos antitabaco de clase IgE, IgG, IgA, IgD ó IgM en los individuos fumadores, que al aspirar el humo se estarán exponiendo a la penetración de más antígenos del tabaco que propiciará, entre otros fenómenos, la formación de complejos inmunopatogénicos que afectarán en menor o mayor grado al tejido pulmonar.

MATERIAL Y METODOS

Obtención del extracto salino del tabaco

Se utilizó el contenido de una cajetilla de cigarrillos (Delicados, Tabacalera Mexicana) de 18 gramos aproximadamente se eliminó el papel del cigarrillo y el tabaco se molieron en licuadora con solución salina-fosfato (SSF) (pH 7.4, 0.15 M) y una vez homogenizado, se extrajeron los compuestos en volúmenes de 450 ml de SSF quedando finalmente al 4% (p/v), es decir que 18 gr. de tabaco en 450 ml. de SSF, se extrajeron a 4°C con agitación continua durante 18 horas.

Se filtró la mezcla a través de una gasa y después con papel Whatman No. 1, en un embudo buchner, se repitió la operación dos veces más y el filtrado se centrifugó a 19000 rpm, a 4°C durante 30 minutos, quedando un sobrenadante transparente de color ámbar, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (57). Se ajustó a una concentración similar al condensado de humo, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20°C.

Obtención del condensado de humo

Se condensó humo de 40 cigarrillos, con 450 ml de SSF. Se determinó su concentración proteica ajustándose a una concentración de 1.3 en el extracto y 1.4 mg/ml para el condensado de humo.

En la figura 3 se esquematiza el sistema usado para la condensación del humo de cigarrillos.

Obtención de anticuerpos antitabaco

El esquema de inmunización fue el siguiente: el primer día se aplicaron 10 mg del extracto salino ó del condensado de humo, homogenizados con 1 ml de adyuvante completo de Freud por vía subcutánea en varios sitios del costado de los conejos. Se usaron 10 conejos albinos (Nueva Zelanda) hembras, con un peso promedio de 2.5 Kg; a los 8 y 15 días siguientes se le aplicaron 10 mg del antígeno, la dosis correspondiente al día 15 se homogenizó con 1 ml de adyuvante incompleto de Freud, al día 22 se aplicaron 10 mg del antígeno por vía intraperitoneal y el día 30 se sangró a los conejos por la vena marginal de la oreja. Se dió una dosis de refuerzo en los días 60 y 90 con 10 mg del antígeno por vía intraperitoneal, sangrando a los conejos 8 días después. La sangre se dejó coagular durante 2 horas, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos y se separó el suero.

Para probar los sueros producidos en conejos se utilizaron las técnicas inmunoserológicas de contraelectroforesis y microdoble inmunodifusión.

Contra inmunoelectroforesis

El método implica la electroforesis en agarosa del antígeno y/o del anticuerpo en dirección opuesta y simultánea a par-

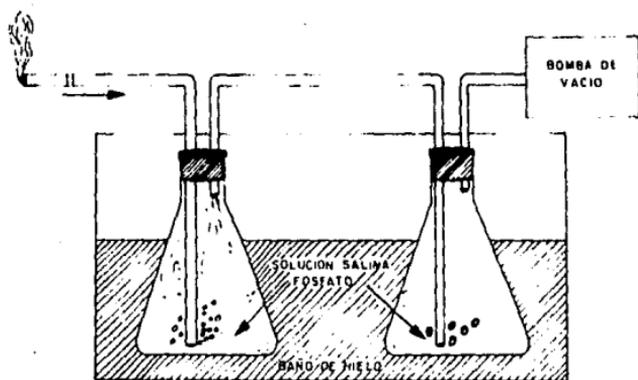


Figura 3 SISTEMA DE CONDENSACION DEL HUMO DE CIGARRILLOS

tir de pozos separados, lo cual acelera la formación de las bandas de precipitación. (63)

- 1.- Se disolvió agarosa al 0.8% en una mezcla salina con pH 8.6 para electroforésis (Sigma), con agua desionizada (v/v) agregando 0.1% de azida de sodio, en un baño de agua a 92°C.
- 2.- Se colocaron 3 ml de agarosa fundida por laminilla, dejando gelificar durante 30 minutos a 20°C.
- 3.- Se hicieron 6 pares de orificios en cada laminilla
- 4.- Se extrajo la agarosa de ellos y se procedió a llenarlos con los antígenos y anticuerpos correspondientes, se utilizó azul de bromofenol-ASB como indicador.
- 5.- Se colocaron en una cámara de electroforésis que contenía la mezcla salina pH 8.6 especial para electroforésis (Sigma), se pasó una corriente de 1.0 mA por cada laminilla hasta que el indicador recorrió 2.5 cm.
- 6.- Se incubó 3 días a 20°C en cámara húmeda.
- 7.- Se lavaron las placas en SSB 0.15 M pH 8.4 durante 5 días a 4°C realizando 2 cambios de esta solución, posteriormente se dejaron 2 horas en agua destilada.
- 8.- Se cubrieron las placas con papel filtro y se metieron en una estufa a 37°C hasta que se secaron.
- 9.- Se tiñeron con azul brillante de Coomassie durante 10 minutos y se contrastaron con la solución decolorante.
- 10.- Se registró el número de bandas de precipitación obtenidas.

Microdoble inmunodifusión

El principio de la prueba de difusión doble en agar se basa en que el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un medio semisólido, las bandas de precipitación que se observan aparecen en la zona de equivalencia donde la concentración del antígeno y del anticuerpo son óptimas para su precipitación, la MID es 10 veces menos sensible que la CIEF. (62,104)

- 1.- Se disolvió agar al 1.5% en SSB y azida de sodio al 0.1% en un baño de agua a 92°C
- 2.- Se depositó el agar en portaobjetos que tenían moldes de lucita y se dejó gelificar durante 30 minutos a 20°C
- 3.- Se guardaron las placas a 4°C en cámara húmeda durante 18 horas.
- 4.- Se colocaron 50 ul de la muestra antigénica problema, que corresponden a la capacidad del orificio del molde de lucita especial para la MID, en el pozo central de cada molde y en los pozos periféricos se depositaron los antisueros.
- 5.- Se dejó difundiendo durante 3 días a 20°C en una cámara húmeda.
- 6.- Se retiraron los moldes y se lavaron las placas en SSB durante 5 días a 4°C, realizando 2 cambios cada tercer día al sexto día se lavaron en agua destilada durante 2 horas.
- 7.- Se tiñeron las placas con azul brillante de Coomassie durante 15 minutos y se contrastaron con la solución

decolorante.

8.- Se registraron las bandas de precipitación obtenidas.

Con el antígeno(s) y anticuerpos antitabaco se procedió a la formación de complejos inmunes tabaco-antitabaco "in vitro":

- 1.- Se mezclaron 0.5 ml de extracto de tabaco a una concentración protéica de 0.68 mg con 1 ml de antisuero anti-tabaco de conejo del primero al cuarto sangrado, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- 2.- Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar los complejos inmunes macromoleculares.
- 3.- Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante el cual contiene los complejos inmunes solubles. Para llevar a cabo la precipitación, la concentración de estos en las tablas - (III, IV y V).

Técnica I para la obtención de complejos inmunes:

- 1.- Se mezclaron 500 μ l de los complejos tabaco-antitabaco con 1500 μ l de una solución reguladora de EDTA y 5 ml de PEG 6000 al 6%.
- 2.- Se incubó la mezcla a 4°C durante 18 horas
- 3.- Se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 5 ml de PEG 6000 al 5% (en dos ocasiones).
- 5.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 200 μ l de PBS-AZ.

6.- Se dejó 20 minutos a 20°C con agitación constante para disolver el precipitado.

7.- Se congelaron a -20°C hasta su uso. (44)

Las muestras precipitadas se estudiaron por electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoelectroforesis.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

En la electroforesis la migración de las proteínas es dependiente de la carga, tamaño y forma de las moléculas. Sin embargo en presencia de SDS todas las proteínas se cargan negativamente y en proporción de su peso, debido a la unión de moléculas del detergente con las proteínas. Cuando éstas son puestas en un campo eléctrico, la separación de las proteínas depende solo de su tamaño y forma. Según la concentración del gel de poliacrilamida, se emplearon patrones con diferentes pesos moleculares. (44,105)

a.- Preparación de los geles:

- 1.- Se prepararon geles de 8 cm de largo y 0.5 cm de diámetro con la solución reguladora del fosfato y las soluciones de acrilamida.
- 2.- Se depositó la mezcla con una pipeta pasteur en tubos de vidrio hasta la marca de 8 cm.
- 3.- Se adicionó agua hasta el borde de los tubos para evitar la desecación del gel y para que la polimerización fuera homogénea.

4.- Se mantuvieron a 20°C durante 12 horas hasta el momento de su uso.

b.- Preparación de la muestra:

- 1.- Se incubaron 10 ul de la solución digestora del gel con 90 ul de la muestra obtenida por la técnica de precipitación I, en un baño maría a 90°C durante 5 minutos.
- 2.- Se enfriaron a 20°C y se les agregó 70 ul de solución indicadora.

c.- Electroforésis:

- 1.- Se eliminó el agua de la parte superior de los tubos y se colocaron 50 ul de la muestra o de un control de proteínas con pesos moleculares conocidos (de 12 a 90 KD).
- 2.- Se acomodaron los tubos en la cámara para electrofo_résis.
- 3.- Se adicionó SSF 0.1 M pH 7 con ayuda de una pipeta pasteur a cada tubo y posteriormente en la cámara.
- 4.- Se aplicó una corriente de 4 mA por tubo hasta que la muestra pasó el extremo superior del gel, y después se aplicaron 8 mA por tubo.
- 5.- Se consideró terminada la electroforé_rsis cuando el colorante indicador llegó al extremo inferior del tubo (aproximadamente 4 horas).
- 6.- Se sacaron los geles de los tubos y se midió el

frente del colorante.

- 7.- Se metieron los geles en una solución fijadora durante 24 horas.
- 8.- Se sacaron y se tiñeron con azul brillante de Coomassie durante 40 minutos.
- 9.- Se contrastaron con una solución decolorante.
- 10.- Se registró el número de bandas obtenidas
- 11.- Se determinó su Rf mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína desde el origen (banda)}}{\text{Distancia desde el origen al punto de referencia (frente del colorante)}}$$

Inmunoelectroforésis

Esta técnica combina la difusión por separación electroforética y la precipitación inmunitaria de las proteínas y muestra la identidad de éstas. (82)

- 1.- Se cubrieron las placas con agar al 1% y se dejaron gelificar.
- 2.- Se perforó el agar y se extrajo de los pozos por succión.
- 3.- Se pusieron las muestras en los pozos y se agregó una gota azul de bromofenol al suero.
- 4.- Se llenó la cámara de electroforésis con la solución reguladora del CIEF.

- 5.- Se ajustó a 100 volts (2.5 mA por laminilla), y se llevó a cabo la electroforésis hasta que el colorante se desplazó 2.5 cm del punto de origen.
 - 6.- Se sacó el agar de los canales y se pusieron en ellos los anticuerpos antiproteínas séricas del conejo, estos antiseros se obtuvieron inmunizando cobayos de acuerdo al esquema señalado al finalizar la técnica de IEF.
 - 7.- Se dejó difundir de 12-24 horas, y se registró el número de bandas y la posición.
 - 8.- Se siguió la misma metodología para lavados y tinción utilizadas en CIEF y MID.
- d.- Obtención de anticuerpos antiproteínas totales de conejo:
- Se inmunizaron cobayos con suero de conejo, el primer día 0.5 ml (250 mg de proteína) más 0.5 ml de A.C.F. por vía intraperitoneal, el día cuatro 0.5 ml del suero de conejo por vía intraperitoneal, el séptimo día 0.5 ml de suero de conejo más 0.5 ml de A.I.F., vía intramuscular, el décimo día 0.5 ml del suero de conejo vía intramuscular, el día décimo tercero se hizo un sangrado de prueba por vía intracardíaca y se probó por IEF, el día décimo sexto se volvió a inmunizar con 0.5 ml del suero de conejo vía intramuscular, y el día vigésimo primero se hizo un sangrado a muerte por vía intracardíaca.

Técnica II para la obtención de complejos inmunes:

- 1.- Se dializaron 3 ml del suero de conejo con solución SSB durante 18 horas a 4°C para eliminar compuestos de bajo peso molecular.
- 2.- A 1 ml de suero dializado se le agregó 0.5 ml de PEG 6000 al 6% y se centrifugó inmediatamente a 2500 rpm durante 10 minutos.
- 3.- Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado 3 veces con solución salina al 9%.
- 4.- El precipitado obtenido de los lavados se resuspendió en 25 ul de una solución de ácido cítrico 0.33 M.
- 5.- Se congeló a -20°C hasta su uso (72).

Características de la población estudiada

- 1.- Sueros de pacientes con enfermedad pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en los parámetros clínicos, pruebas de funcionamiento respiratorio, laboratorio y de biopsia (16).
- 2.- Sueros de sujetos sanos desde el punto de vista clínico (sin manifestaciones aparentes de problemas infecto-contagiosos recientes), se obtuvieron de sujetos a los cuales se les realizó una revisión de rutina, y de donadores voluntarios.

Los dos grupos de sujetos estudiados se dividieron en dos subgrupos:

a) Fumadores

b) No fumadores

Las características de las poblaciones estudiadas se describen en la tabla B.

Metodología empleada en el procesamiento de las muestras:

Al suero de los pacientes y controles se les realizó CIEF. Se precipitaron los complejos inmunes de ambos grupos por la técnica I y II, el precipitado obtenido por la técnica I se uso para determinar los constituyentes del complejo inmune por electroforésis en geles de poliacrilamida e inmunoelectroforesis.

La obtención de anticuerpos antiproteínas totales del humano se hizo en conejos que fueron inmunizados con 1 ml de suero humano siguiendo el esquema señalado para la obtención de anticuerpos antitabaco.

El precipitado obtenido por la técnica II se sometió a CIEF, después de disociar el complejo inmune con una solución de ácido cítrico para demostrar la presencia del antígeno y del anticuerpo. En los dos grupos de sujetos estudiados se realizó inmunodifusión radial para cuantificar la IgA en los complejos inmunes obtenidos por la técnica I.

Inmunodifusión radial

Se utilizaron placas para inmunodifusión Tri-Partigen (Hoechst) que contienen agar en el cual se ha incorporado el suero anti-inmunoglobulina A humana y 1 mg/ml de azida de sodio.

Tabla B.- Características de la población estudiada

	No. casos	S E X O		EDAD PROMEDIO	
		F	M	F	M
INDIVIDUOS					
SANOS	46	12	34	40	40
NEUMOPATAS :	56	33	23	44	58
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	22				
Asma bronquial	12				
Fibrosis pulmonar	9				
Neumonitis intersticial	5				
Alveolitis alérgica extrínseca	4				
Cáncer pulmonar	2				
Bronquiectasia	1				
Bagasosis	1				

Esta determinación se hizo porque el sistema inmunosecretor respiratorio tiene un papel importante en la interacción del tabaco con el sujeto.

- 1.- Los pozos 1,2,3 se llenaron con 5 μ l respectivamente del estándar de inmunoglobulina A (Hoechst).
- 2.- Los pozos 4-6 se llenaron cada uno con 5 μ l del complejo inmune en estudio.
- 3.- Se cerró la placa y se dejó a temperatura ambiente; la evaluación fue hecha después de 50 horas de difusión.
- 4.- Se midieron los diámetros de los anillos de precipitación formados en cada placa empleando una regla calibrada (0.1 mm)
- 5.- Los diámetros al cuadrado de los anillos de precipitación obtenidos con las diluciones estándar 1,2,3 se graficaron contra sus respectivas concentraciones sobre el papel milimétrico. Se obtuvo una línea recta; los valores para los complejos inmunes se determinaron por extrapolación en esta gráfica.

La evaluación estadística se hizo por las pruebas de "t" de Student y la de χ^2 , teniendo en cuenta que la población en estudio fue dividida en 8 grupos; primeramente dos grupos: el de enfermos y los controles sanos, estos tenían subgrupos de fumadores y no fumadores y por último cada uno de estos se dividieron de acuerdo al sexo. Se realizaron las evaluaciones estadísticas de las combinaciones posibles entre los grupos y únicamente se

discutirán aquellas que tuvieron una significancia estadística.

S O L U C I O N E S

Solución salina borato (SSB) 0.15 M pH 8.4

a) Solución reguladora de boratos

Acido bórico	6.18 g
Borato de sodio	9.53 g
Cloruro de sodio	4.38 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar el pH a 8.4 con HCl ó NaOH	

b) Mezclar 5 partes de la solución reguladora de boratos con 95 partes de solución salina 0.15 M.

Solución colorante de azul brillante de Coomassie

Metanol	454 ml
Acido acético glacial	92 ml
Agua destilada	454 ml
Azul brillante de Coomassie R-250	1.25 g

Mezclar el azul brillante con el metanol y agitar durante 24 horas, a 20°C en frasco ámbar.

Filtrarlo y adicionarle el ácido acético y el agua

Guardarlo en frasco ámbar a 20°C.

Solución decolorante

Acido acético glacial	50 ml
Metanol	50 ml
Glicerol	10 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Solución reguladora de EDTA 0.2 M pH 7.5

EDTA disódico	76.0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1 N	

Solución reguladora salina borato (SSB) pH 8.3 para precipitación de complejos inmunes.

Acido bórico 0.1 M	
Tetraborato de sodio 0.25 M	
Cloruro de sodio 0.75 M	
Mezclar las 3 soluciones y ajustar el pH con NaOH 6 HCl	
Poliethylenglicol 6000	50 g
SSB pH 8.3 para precipitación de complejos inmunes	1000 ml

Solución fijadora para geles de poliácridamida.

Acido tricloroacético	57.0 g
Acido sulfosalicílico	17.0 g
Metanol	150 ml
Agua destilada	350 ml

Solución salina-fosfato 0.15 M, pH. 7.4 (SSF)

Cloruro de sodio 0.1 M	
Fosfato de Sodio dibásico 0.1 M	
Fosfato de sodio minobásico 0.1 M	
Mezclar la solución de cloruro de sodio con la de fosfato de sodio dibásico y ajustar el pH a 7.4 con la solución	

de fosfato de sodio monobásico

Solución reguladora salina fosfato con azida de sodio pH

7.2 (PBS-AZ) para complejos inmunes.

Fosfato de sodio dibásico anhidro 0.01 M

Fosfato de sodio monobásico anhidro 0.0. M

Azida de sodio 0.1%

Cloruro de sodio 0.15 M

Mezclar la solución de fosfato de sodio dibásico a la de cloruro de sodio y ajustar el pH a 7.2 con la solución de fosfato de sodio monobásico. Posteriormente se añade azida de sodio.

Solución decolorante para geles de poliacrilamida

Metanol	5%
Acido acético	5%
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Solución reguladora de fosfato de sodio

0.2 M con 0.2 % de SDS	12.5 ml
Acrilamida al 40%	4.69 ml
Bisacrilamida al 2%	2.54 ml
Agua destilada	4.0 ml
Persulfato de amonio 5 mg/ml de agua	1.25 ml
TEMED	0.025 ml

Solución digestora

Solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 7	80 ml
SDS al 10%	10 ml
Beta-Mercaptoetanol	10 ml

Solución Indicadora

Solución reguladora de fosfatos 0.2 M con 0.2% de SDS	5.0 ml
Beta-Mercaptoetanol	0.5 ml
Azul de bromofenol	2.0 mg
Glicerina	5.0 ml

RESULTADOS

Propiedades Inmunoquímicas del tabaco

El extracto de tabaco utilizado tuvo una concentración proteica similar al condensado de humo de tabaco. El extracto salino dió 1.40 mg/ml, el condensado tuvo 1.36 mg/ml. Por CIEF y MID se les enfrentó contra los anticuerpos antitabaco obtenidos en conejos inmunizados con extracto salino y con condensado de humo, se observaron hasta 4 bandas de precipitación (tabla II). (Figura 4).

La prueba de EGPA con 50 ml (70 µg) del condensado de humo mostró hasta 4 bandas con pesos moleculares de 18 a 67 kd (Tabla I, Figura 5). La EGPA de 50 ml (210 µg) del extracto salino permitió la observación de 2 bandas, una de 18 Kd y la otra de 67 Kd.

Características de los complejos inmunes tabaco-antitabaco formados in vitro.

Para conocer las características de los complejos inmunes tabaco-antitabaco, se procedió a la inmunización de conejos para la obtención de los anticuerpos antitabaco y estos se mezclaron in vitro con los antígenos de tabaco a concentraciones conocidas, los complejos inmunes formados fueron sometidos a un análisis inmunoserológico que permitió tener un patrón de referencia para comparar los complejos inmunes in vivo, en sujetos sanos y enfermos, fumadores y no fumadores.

El complejo inmune formado in vitro por el suero antitabaco y el extracto salino aislado de acuerdo a la técnica de II y disociado posteriormente con ácido cítrico, se enfrentó en CIEF al extracto salino y se observó una banda de precipitación en el 80% de los conejos, lo cual permite inferir la presencia de anticuerpos en el complejo inmune que reaccionaron con los antígenos del tabaco. Al enfrentar los complejos inmunes a los antiseros antitabaco se observó una banda de precipitación en el 90% de la población, lo cual señala la presencia del antígeno en el complejo inmune, por lo anterior concluimos que este complejo inmune contiene los inmunoreactantes correspondientes a los anticuerpos antitabaco y el antígeno(s) del tabaco.

La EGPA de los complejos inmunes obtenidos de acuerdo a la técnica I mostró de 1 a 2 bandas con un peso molecular de 50 a 79 Kd (Tabla III).

El complejo inmune formado in vitro por el antisuero antitabaco y el condensado de humo y procesado según la técnica II en la cual se trató a los complejos con ácido cítrico, se enfrentaron por CIEF al condensado de humo y se observó una banda de precipitación en 90% de la población; al enfrentar el complejo inmune disociada al antisuero contra tabaco producido en conejos, se observó una banda de precipitación en el 100% del grupo.

La EGPA del complejo inmune aislado por la técnica I mostró de 1 a 2 bandas en el 70% de la población y el peso molecular osciló entre 7 hasta 67 Kd (Tabla IV y Fig. 6).

Los antisueros de conejo antitabaco mezclados solamente con SSF fueron procesados por la técnica II para la separación de los complejos inmunes, que posiblemente se formaron in vivo y después de disociar estos complejos inmunes se probaron por CIEF, demostrándose una banda de precipitación en el 80% de los conejos contra el extracto salino y en el 90% contra el condensado de humo. Al enfrentar los complejos inmunes disociados contra los anticuerpos antitabaco obtenidos en conejos se observó una banda de precipitación en el 100% de los conejos. Lo anterior apoya la presencia de los complejos inmunes circulantes formados in vivo en los conejos inmunizados con productos de tabaco.

La EGPA de los complejos inmunes obtenidos por la técnica I de los sueros, mostraron de 1 a 2 bandas con peso molecular entre 50 y 78 Kd (Tabla V). Los complejos inmunes de los conejos inmunizados con tabaco y obtenidos según la técnica I mostraron por inmunoelectroforesis una banda de precipitación en la región de la albúmina en el 100% de los conejos y de una a dos bandas en la región de las gammaglobulinas del 80% de estos animales.

Presencia de antígenos de tabaco y anticuerpos antitabaco en el suero de pacientes con enfermedades pulmonares.

Se estudió una población de 56 pacientes con diagnósticos de problemas pulmonares crónicos, de los cuales 25 eran fumadores y 31 no fumadores.

La CIEF mostró que el 100% de los fumadores fueron positivos al enfrentarlos contra el extracto salino y negativos con el condensado de humo. Al enfrentarlos a los antisueros el 44% fueron positivos, en los no fumadores: el 100% presentó una banda de precipitación contra el extracto salino y fueron negativos cuando se enfrentaron al condensado de humo. El 41% de los sueros reaccionaron con el antisuero antitabaco, apoyándose la presencia del antígeno(s) del tabaco en la circulación de los pacientes. (Tabla IV)

Determinación del antígeno de tabaco en el suero de personas sanas.

Se estudiaron 46 sujetos clínicamente sanos, de los cuales 32 fueron fumadores (25% del sexo femenino y 75% del sexo masculino) y 14 no fumadores (72% femeninos y 28% masculinos). Al enfrentar los sueros del grupo de fumadores por CIEF contra el extracto salino el 44% fue positivo (Tabla IV). Contra el condensado de humo fue positivo el 53% los dos grupos presentaron una banda de precipitación. En el grupo de no fumadores, constituido por 14 sujetos, el 71% tuvo una banda de precipitación por CIEF al enfrentarlos al extracto salino (Tabla VI). El 71% fue positivo contra el condensado de humo. (Figura 7)

Tanto el grupo de fumadores como no fumadores fueron negativos al enfrentarlos contra los antisueros antitabaco obtenidos de conejos lo que permite señalar la ausencia del antígeno del tabaco libre en el suero de sujetos sanos.

Presencia de IgA en los complejos inmunes de pacientes fumadores y no fumadores con enfermedad pulmonar.

En el grupo de 25 pacientes fumadores el 100% tuvo IgA en el complejo inmune con una concentración de 0.46 a 2.84 mg/ml y un promedio de 1.41 (\pm 0.76) mg/ml (Tabla VI).

En el grupo de 31 pacientes no fumadores con enfermedad pulmonar el 96% tuvieron IgA y su concentración en el complejo inmune fue de 0.29 a 2.75 mg/ml con una media de 1.26 (\pm 0.85) mg/ml (Tabla VI) (Figura 8).

Presencia de IgA en los complejos inmunes de controles sanos fumadores y no fumadores.

En el grupo de los sujetos controles sanos fumadores, constituido por 32 personas el 100% de los casos fueron positivos, con una concentración de IgA en los complejos inmunes de 0.14 mg/ml a 0.34 mg/ml y una media de 0.19 (\pm 0.06) mg/ml (Tabla VI).

Los individuos controles sanos no fumadores estuvo constituido por 14 sujetos siendo positivos el 100% con una concentración de IgA en los complejos inmunes de 0.11 a 0.29 mg/ml y una media de 0.15 (\pm 0.05) mg/ml (Tabla VI). (Figura 9).

Contenido de inmunoreactantes en los complejos inmunes de pacientes con enfermedad pulmonar y controles sanos.

Por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se tuvo un 92% de positividad para el grupo de fumadores formado por 25 pacientes: se registraron de 3 a 6 bandas, con una media de

4.0 (± 1) bandas por paciente; el peso molecular fue entre 14 a 90 Kd; de 31 pacientes no fumadores el 93% fue positivo registrándose de 2 a 6 bandas con una media de 4(± 1) bandas y el peso molecular fue entre 14 a 68 Kd (Tabla VI). (Figura 10).

En los controles sanos se tuvo una positividad del 100% para el grupo de fumadores constituido por 32 sujetos; se registraron de 2 a 9 bandas con una media de 7 (± 2) bandas y su peso molecular fue entre 12 a 90 Kd de los cuales 14 sujetos sanos no fumadores el 92% fue positivo, registrando de 2 a 9 bandas y una media de 6.0 (± 2) bandas y su peso molecular fue entre 14 a 95 Kd (Tabla VI) (Fig. 11).

Presencia de antígenos de tabaco y anticuerpos antitabaco en el complejo inmune de pacientes con enfermedad pulmonar.

Al complejo inmune obtenido según la técnica II se le realizó CIEF; al enfrentar los complejos inmunes del grupo de fumadores contra el extracto salino el 72% fue positivo y contra el condensado de humo fue positivo el 60%, ambos grupos presentaron una banda de precipitación; al enfrentarlos al antisuero antitabaco producido en conejo de 100% fue positivo (Tabla VI) con 2 bandas de precipitación.

En el grupo de no fumadores el 65.0% fue positivo el extracto salino (Tabla VI) y con el condensado de humo se tuvo una banda de precipitación, al enfrentarlos al antisuero antitabaco producido en conejo el 100% fue positivo (Tabla VI) con una banda de precipitación.

Presencia de antígenos de tabaco y anticuerpos antitabaco en el complejo inmune de personas sanas.

Al complejo inmune obtenido según la técnica II se le realizó CIEF; en el grupo de fumadores contra el extracto salino el 56.2% fue positivo (Tabla VI) y contra el condensado de humo 12.5 %, ambos grupos presentaron una banda de precipitación pero al enfrentarlos al antisuero antitabaco fueron negativos (Tabla VI). En el grupo de no fumadores el 28% fue positivo (Tabla VI) al enfrentarlo al extracto salino con una banda de precipitación y contra el condensado de humo fue negativo; al enfrentar los sueros contra el antisuero antitabaco producido en conejos los resultados fueron negativos (Tabla VI).

La inmunoelectroforésis de los complejos inmunes obtenidos según la técnica I reveló un componente en la región de la albúmina, uno en la de gammaglobulina y uno ó dos más que correspondían a otras proteínas del suero.

Tabla 1.- Propiedades inmunoquímicas del tabaco

Productos de tabaco	Concentración protéica (mg/ml)	*C I E F	*MID	Bandas en electroforésis de GPA-SDS
Extracto SSF	4.20	1-4*	1-4	2
Extracto SSF	1.40	1-4	1-4	0
Condensado de humo	1.36	1	Neg	1-4

*El antisuero antitabaco fue producido en conejos

Tabla 1.- Propiedades inmunoquímicas del tabaco

Productos de tabaco	Concentración protéica (mg/ml)	*C I E F	*MID	Bandas en electroforesis de GPA-SDS
Extracto				
SSF	4.20	1-4*	1-4	2
Extracto				
SSF	1.40	1-4	1-4	0
Condensado de humo	1.36	1	Neg	1-4

*El antisuero antitabaco fue producido en conejos

Tabla II.- Reactividad de los antisueros antitabaco contra antígenos de tabaco

ANTISUERO DE CONEJO	C I E F		M I D	
	ET*	CH**	ET*	CH**
<u>ANTI ET⁺</u>				
1	4	1	1	Neg
2	1	Neg	1	Neg
3	3	Neg	4	Neg
4	1	Neg	2	Neg
5	1	Neg	2	Neg
<u>ANTI CH⁺</u>				
6	1	1	2	Neg
7	2	1	2	Neg
8	3	Neg	2	Neg
9	1	Neg	2	Neg
10	1	Neg	1	Neg

*Extracto de tabaco SSF ** Condensado de humo

+Antisueros obtenidos en el cuarto sangrado. Ver esquema de inmunización

Tabla III.- Características de los complejos inmune tabaco-antitabaco formados "in Vitro"

Extracto de tabaco-SSF + Antisuero de Conejo	Concentración Protéica CI (mg/ml)	C	I	E	F	Electroforesis en geles de PA-SDS	
		Ag ⁺			Ac ⁺⁺	Número de bandas	P.M. (Kd)
1	1.12	1		1		1	68
2	1.12	1		1		1	76
3	1.20	1		1		1	74
4	1.20	Neg		1		1	74
5	0.60	Neg		1		1	74
6	0.90	1		1		1	74
7	0.60	1		Neg		1	74
8	0.80	1		1		1	74
9	1.15	1		1		2	78 y 50
10	0.84	1		1		1	58

+ Extracto de tabaco - SSF

++ Anticuerpos antitabaco elaborados por conejos

Tabla IV.- Características de los complejos inmunes del condensado de humo y anticuerpos antitabaco formados
in Vitro

Condensado de humo + Antisuero de conejo	Concentración protéica del CI * (mg/ml)	C Ag ⁺	I	E	P Ac ⁺⁺	Electroforésis en geles de PA-SDS	
						Número de bandas	P.M. (Kd)
1	0.55	1		1		1	67
2	1.12	1		1		1	67
3	1.00	1		1		1	60
4	0.88	Neg		1		1	54
5	0.84	1		1		Neg	-
6	0.75	1		1		2	70 y 65
7	0.95	1		1		Neg	-
8	0.47	1		1		Neg	-
9	1.15	1		1		1	56
10	0.93	1		1		Neg	-

+ Condensado de humo

++ Anticuerpos antitabaco elaborados en conejos

* Complejo inmune

Tabla V.- Características de complejos inmunes con antisuero de conejo y solución reguladora de fosfatos

Suero de conejo antitabaco + SSF	Concentración protéica del CI (mg/ml)	C I E F			Electroforesis en geles de PA-SDS	
		ETSSF	CH	Ac ⁺	Número de bandas	P.M. (Kd)
1	0.23	1	1	1	1	68
2	0.28	1	-	1	1	76
3	0.29	1	1	1	1	74
4	0.12	-	1	1	1	74
5	0.17	-	1	1	1	74
6	0.12	1	1	1	1	74
7	0.12	1	1	1	1	74
8	0.12	1	1	1	1	74
9	0.11	1	1	1	2	78 y 50
10	0.26	1	1	1	1	58

⁺Anticuerpos antitabaco producidos en conejos

Tabla VI.- Detección y análisis de IgA, anticuerpos y antígenos de tabaco en complejos inmunes circulantes de pacientes con enfermedades pulmonares y sujetos sanos, fumadores y no fumadores

	Enfermos pulmonares fumadores	Enfermos pulmonares no fumadores	Sujetos sanos fumadores	sujetos sanos no fumadores
No. casos	25	31	32	14
% hombres	84	6	75	28
% mujeres	16	94	25	72
IgA en CI ¹				
% positividad	100	96	100	100
rango (mg/ml)	0.46-2.84	0.29-2.75	0.14-0.34	0.11-0.29
\bar{x} DS (mg/ml)	1.41±0.76	1.26±0.85	0.19±0.06	0.15±0.05
EGPA ²				
% positividad	92	93	100	92
No. bandas	3-6	2-6	2-9	2-9
\bar{x}	4±1	4±1	7±2	6±2
P.M. ³ (Kd)	14-90	14-68	12-90	14-95
CIEP ⁴ con suero total				
% positivos detec. Ac ⁵	100	100	44	71
% positivos detec. Ag ⁶	44	41	0	0
CIEP con detec. Ac ⁸	72	65	56	28
pptado PEG ⁷ % positivo detec. Ag ⁹	100	100	0	0

1.- Complejo inmune

2.- Electroforesis en gel de poli-acrilamida -SDS

3.- Peso molecular

4.- Contra-inmuno-electroforesis

5.- Anticuerpos libres detectados por medio de un extracto de tabaco

6.- Antígenos solubles detectados por medio de un suero anti-tabaco

7.- Polietilenglicol 6000

8.- Anticuerpos en complejos inmunes disociados

9.- Antígenos en complejos inmunes disociados

Tabla VII.- Análisis de los datos que tuvieron una significancia estadística en la población estudiada

Enfermos (A)				Sanos (B)			
Fumadores		No fumadores		Fumadores		No fumadores	
Masc.(1)	Fem.(2)	Masc.(3)	Fem.(4)	Masc.(5)	Fem.(6)	Masc.(7)	Fem.(8)

Se observó mayor frecuencia de anticuerpos contra el extracto salino en el grupo de enfermos fumadores masculinos (1) que en sanos fumadores masculinos (5). X^2 : $p < 0.0009$

Mayor frecuencia de los anticuerpos contra el condensado de humo en el grupo de enfermos fumadores masculinos(1) que en sanos fumadores masculinos (5) X^2 : $p < 0.001$

Mayor frecuencia de los anticuerpos contra el extracto salino en el grupo de enfermas fumadoras femeninas (2) que en sanas fumadoras (6) X^2 : $p < 0.0002$

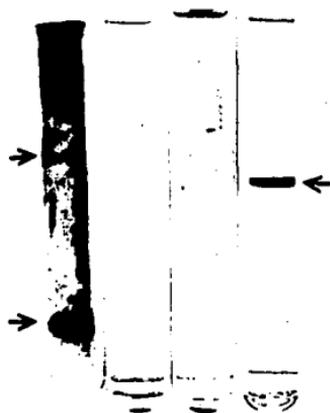
Mayor frecuencia de anticuerpos contra el condensado de humo en el grupo de mujeres sanas fumadoras (6) que en mujeres enfermas no fumadoras (4) X^2 : $p < 0.006$

La población de enfermos(A) se detectó antígenos de tabaco en su forma libre y disociada de los complejos inmunes y en los sanos(B) fue negativo. X^2 : $p < 0.001$

El contenido de IgA en los complejos inmunes de enfermos(A) fue mayor en relación con los sanos(B) t: $p < 0.001$



Figura 4 Bandas de precipitación entre el extracto salino (pozo central) y los anticuerpos antitabaco producidos en conejo, (pozos periféricos)



• Figura 5.- Electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS del condensado de humo (A y D), del PEG 6000 (B) y del extracto salino (C), observándose los componentes con pesos moleculares de 18 y 67 Kd.



Figura 6.- Componente de 67 Kd, en los complejos inmunes de los sueros de conejo antitabaco y el condensado de humo obtenidos in vitro .

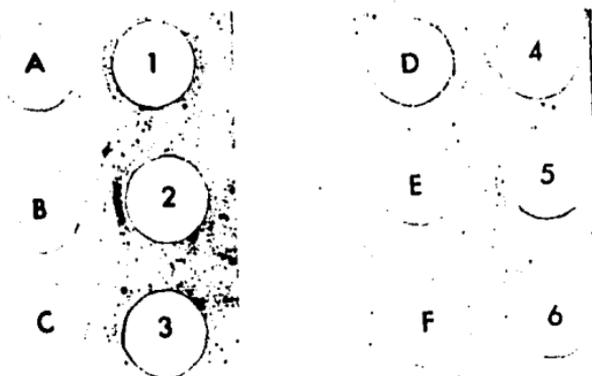


Figura 7.- CIEF en donde se enfrenta el extracto de tabaco-SSF (A-B-C-C-E-F) en contra de sueros de individuos sanos no fumadores. (1-2-3-4-5-6).

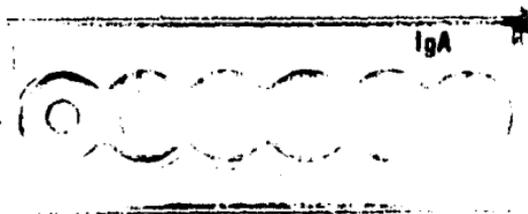


Figura 8.- Halos de precipitación obtenidos por IDR, curva de referencia de IgA (1,2,3) complejos inmunes precipitados con PEG 6000 de pacientes con enfermedad pulmonar y tabaquismo negativo (4), y complejos inmunes de pacientes con enfermedad pulmonar y tabaquismo positivo (5 y 6).



Figura 9.- Halos de precipitación obtenidos por IDR, curva de referencia de IgA, (1,2,3) complejos inmunes precipitados con PEG 6000 de controles inmunes precipitados con PEG 6000 de un control sano con tabaquismo negativo. (6)

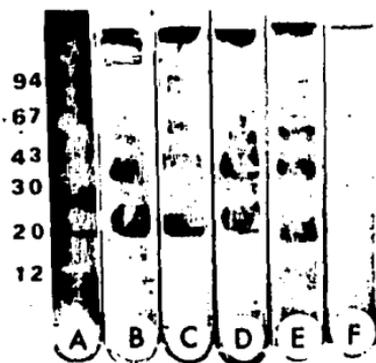


Figura 10. Patrón de bandas en la electroforésis en gel de PA-SDS de: (A) proteínas de PM conocido: lisosima (12 Kd), inhibidor de la tripsina (20Kd), anhidrasa carbónica (30 Kd), Ovoalbúmina (43 Kd), albúmina (67 Kd) y fosfatasa b (94 Kd), muestras de complejo inmunes obtenidos por la técnica I de pacientes fumadores (B-C) y de pacientes no fumadores. (D-E-F)

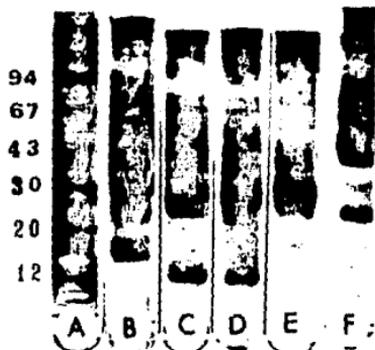


Figura 11.- Se muestra el patrón electroforético en gel de PA-SDS de: (A) proteínas de PM conocido: lisosima (12 Kd), inhibidor de la tripsina (20 Kd), anhidrasa carbónica (30 Kd), ovoalbúmina (43 Kd), albúmina (67 Kd) y fosfatasa b(94 Kd); muestras de complejos inmunes obtenidos por la técnica I de controles sanos fumadores, (B-C) y de controles sanos no fumadores (D-E-F).

D I S C U S I O N

Al fumar un cigarrillo la incineración puede destruir el material protéico. Por lo que se consideró que la formación de un gradiente de temperatura en el cigarrillo, puede arrastrar algunos componentes de bajo peso molecular o productos parcialmente desnaturalizados de las proteínas del tabaco, que al introducirse como un aerosol en el aire inhalado durante la aspiración del humo del tabaco, podrían estimular la respuesta inmune contra los constituyentes del tabaco. Las partículas del humo de tabaco de aproximadamente 10 micras de diámetro se depositan en vías respiratorias altas, tráquea o conductos respiratorios mayores mediante sedimentación gravitacional ó fijación a las paredes. Las partículas menores de 0.1 micra llegan a los alveolos gracias a su alto coeficiente de difusión, las de 0.5 se mantienen en el aire y son expulsadas durante la exhalación y las partículas de una micra tienden a depositarse en las partes del pulmón donde ocurre el intercambio gaseoso.

La dosis total de partículas absorbidas dependerá de la ventilación/minuto del sujeto y, en consecuencia, aumentará con el ejercicio. La respiración por la boca permite una mayor penetración de este material en el pulmón que la respiración por la nariz, de manera que el ambiente puede influir en el riesgo de padecer una enfermedad causada por los agentes aspirados (100).

El fumador retiene entre el 80 y el 90% de las partículas contenidas en el humo cuando la inhalación es sostenida durante dos a cinco segundos (9).

Se tiene evidencia de que al inyectar albúmina con diferentes concentraciones en cigarrillos y estos ser sometidos al proceso de combustión, se detecta la albúmina en el condensado de humo por medio de técnicas inmunoserológicas y por la concentración protéica que se obtiene en el condensado de cigarrillos tratados con albúmina. (Comunicación personal, Chávez, R. y Martínez R.D.)

Con el objeto de estandarizar la extracción y obtención del condensado de humo se usaron varias cantidades del tabaco definidos por gramo de peso y por número de cigarrillos incinerados. En el proceso de extracción utilizamos 18 gr. de tabaco y en el condensado de humo 36 gr. para tener una concentración similar en ambas preparaciones y poder comparar los resultados. En las pruebas inmunoserológicas realizadas se vio que una concentración de 1.4 mg/ml, tanto del extracto como del condensado de humo, fueron adecuadas para analizar las proteínas del tabaco. Para las pruebas de electroforésis en geles de poliacrilamida se requirieron 4.2 mg/ml en la identificación de los componentes protéicos del tabaco solamente en el extracto.

En la preparación del extracto salino se utilizó el tabaco de los cigarrillos sin someterlo a ningún cambio físicoquímico. Se demostraron de 1 a 4 sistemas antígeno-anticuerpo por CIEF y MID, con el extracto frente a un suero hiperinmune. En electroforésis se obtuvieron 2 bandas, una con un peso de 18 Kd

y otra de 68 Kd la primera tiene un peso similar a la glicoproteína del tabaco que fue descrita por Becker y col. (5) y podría ser que la proteína de 68 Kd se degrade y dé lugar a la de 18 Kd.

En el condensado de humo se identificó un sistema antígeno-anticuerpo por CIEF y en la electrofóresis se obtuvieron de 1 a 4 bandas con un peso de 18 a 68 Kd. Estos resultados indican que en el extracto salino se detectan más componentes antígenicos que en el condensado, aunque ambos tienen un número similar de componentes proteicos: uno de 68 Kd y otro de 18 Kd.

Las variaciones en el tabaco utilizado en las técnicas de extracción y los estudios inmunoserológicos que se han realizado con éstos determinan variaciones en los estudios sobre el tabaco y la respuesta inmune antitabaco. Lehrer (53) utilizó tres productos de la hoja de tabaco procesada, precipitando las proteínas con sulfato de amonio y por inmunodifusión comprobó que los extractos son inmunogénicos para conejos. Gleich (33) utilizó hojas de tabaco, hojas de tabaco procesadas y condensado de humo (Laboratorios Meloy) haciendo sus extracciones con eter de petróleo y al pasar sus muestras por EGPA-SDS el condensado de humo tuvo bandas de 11 y 14 Kd y 3 de 60 a 69 Kd; en la hoja de tabaco hubieron 5 bandas de 17 a 68 Kd y en las hojas procesadas de tabaco hubieron 2 bandas de 15 y 30 Kd y 3 de 60 a 69 Kd, estos productos fueron inmunogénicos para el conejo. Harkavy (13) demostró que un extracto crudo de tabaco fue inmunogénico para conejos. Chu (17) también utilizó un ex

tracto crudo de tabaco y obtuvo hasta 3 bandas de precipitación por CIEF al enfrentar el extracto al antisuero de conejos. Morales (68) y Preciado (75) utilizaron cigarrillos comerciales para obtener extracto salino y condensado de humo y demostraron que son inmunogénicos para conejos por medio de CIEF. En todos los conejos empleados en nuestro trabajo fueron inmunizados con el extracto salino, demostrándose anticuerpos que reaccionaron contra el antígeno homólogo y contra el condensado de humo en 1/5 animales. Dos de los 5 conejos inmunizados con el condensado produjeron anticuerpos contra éste y todos contra el extracto salino (Tabla II).

En base a la información anterior y nuestros resultados, podemos concluir que algunos productos del tabaco son inmunogénicos en conejos, utilizando diversos productos de tabaco como antígenos que incluyen la hoja, el tabaco procesado ó en forma de cigarrillos los cuales además recibieron diferentes tratamientos y se probaron con distintas técnicas inmunoserológicas; en todos los casos con mayor o menor positividad los productos del tabaco fueron inmunogénicos para el conejo.

También se han valorado antígenos del tabaco en individuos fumadores y no fumadores. Becker (5) purificó una glicoproteína de 18 Kd que es inmunogénica para el conejo y el cobayo, que despierta una reacción cutánea de hipersensibilidad inmediata tanto en los individuos fumadores como no fumadores.

Romanski (79) obtuvo un extracto de hoja de tabaco y llevó a cabo su extracción con diferentes solventes empleando una parte del pulverizado de la hoja de tabaco y 2 partes del sol

vente, la extracción fue a 4°C por 14 días; obtuvo 4 preparaciones con una concentración similar en las 4 y utilizó el método de doble inmunodifusión de Ouchterlony (91) con los sueros de 70 pacientes con isquemia o infarto del miocardio de los cuales 49 eran fumadores y 21 no fumadores y también practicó pruebas intracutáneas. En las pruebas cutáneas 41 pacientes fumadores fueron positivos y 8 fueron negativos, en los no fumadores resultaron positivos 7 de 21. También se encontraron anticuerpos antitabaco en el suero de 13 pacientes fumadores pero no en el de no fumadores.

Morales (68) y Preciado (75) obtuvieron un alto porcentaje de positividad de anticuerpos antitabaco tanto en individuos fumadores como no fumadores quizá debido a que los métodos de extracción y las técnicas inmunoserológicas utilizadas fueron más sensibles que las empleadas en otros trabajos.

Los resultados que obtuvimos en pacientes con enfermedades pulmonares fueron similares a los de otros trabajos (68, 75) en los que también hay una elevada frecuencia de anticuerpos antitabaco.

En el estudio de los complejos inmunes en tabaquismo se obtuvo la siguiente información: El extracto ó condensado mezclado con el antisuero de los conejos mostró por CIEF que el complejo inmune in vitro reconoció al antígeno y al anticuerpo, pero por MID los resultados fueron negativos. La IEF del complejo inmune y los anticuerpos contra el suero de conejo mostró una banda de precipitación en la región de la albúmina en 100% de las muestras y en el 70% presentaron una banda de

precipitación en la región de las gammaglobulinas; la albúmina puede corresponder a la de los conejos o a la del albuminoide del propio tabaco (107), pero se necesitan más estudios al respecto.

Al realizar la electroforésis en geles de PA-SDS encontramos en la mayoría de los conejos de 1 a 2 bandas y su peso molecular osciló de 7 a 78 Kd siendo similar el patrón del complejo inmune formado in vitro con el ES y el CH, esto permite tener un patrón de referencia de lo que posiblemente esté ocurriendo in vivo en el conejo porque al precipitar solamente el antisuero de conejo en solución reguladora de fosfatos se obtiene un complejo inmune circulante en el suero del animal en el que por CIEF se demuestra al antígeno(s) de tabaco y al anticuerpo antitabaco sugiriéndose que el conejo in vivo tiene complejos inmunes, por lo anterior se apoya la similitud del patrón obtenido in vivo e in vitro en conejos.

Las diferencias entre la situación natural de exposición a los antígenos del tabaco que ocurre en humanos al aspirar el humo y el modelo experimental en conejos son:

- a) la vía de entrada es diferente ya que en el humano es a través del aparato respiratorio y se estimula principalmente al sistema inmunocompetente del pulmón, en cambio en el conejo se inocula por vía subcutánea e intraperitoneal.
- b) la dosis de antígenos de tabaco en el humano es muy variable de acuerdo a las características del hábito

tabaquico y en los conejos la inoculación se hace con las concentraciones conocidas y con una periodicidad establecida.

- c) la obtención de los sueros en humanos con anticuerpos, antígenos y complejos inmunes de tabaco-antitabaco ocurre en tiempos variables y en los conejos la obtención del suero es en tiempos preestablecidos.
- d) en el caso de la formación de complejos inmunes in vitro los antisueros antitabaco y los antígenos de tabaco son mezclados en cantidades conocidas y los complejos inmunes resultantes se analizaron por las técnicas I y II (ver material y métodos).
- e) los sueros provenientes de humanos no se mezclaron con antígenos de tabaco in vitro y sólo se analizaron estos sueros siguiendo las técnicas I y II.
- f) en el modelo natural se hizo la determinación de IgA en el complejo inmune; sin embargo no se llevó a cabo la búsqueda de IgA en el modelo experimental.

El análisis estadístico realizado en los individuos estudiados indica que con respecto a la edad no hay diferencia entre el grupo de controles y de enfermos fumadores y no fumadores del sexo femenino, en cambio en el sexo masculino sí hay una diferencia significativa en la edad de los sanos compara-

dos con enfermos fumadores y no fumadores ($p < 0.001$). Hay mucho más hombres fumadores, tanto sanos como enfermos que, mujeres fumadoras.

No hay diferencia en el número de cigarrillos que consumen los hombres sanos y enfermos que es en promedio 17 cigarrillos al día; las mujeres sanas y enfermas fumadoras consumieron un promedio de 12 cigarrillos por día.

La diferencia de la duración del hábito tabáquico entre hombres sanos y enfermos fue significativa ($p < 0.001$), siendo de 13 años en los sanos y de 33 en los enfermos.

En los hombres fumadores predominó el diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica ($p < 0.0009$) comparándolos con el grupo de mujeres enfermas no fumadoras, que tuvieron asma bronquial con mayor frecuencia.

La información anterior apoya la importancia del número de años de tabaquismo en la generación de daño pues incrementa el riesgo de padecer diversas enfermedades cardiopulmonares (106,107), especialmente de padecimientos pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (76,12).

Se comprobó la presencia de anticuerpos contra el extracto de tabaco en el 100% de los sueros de individuos enfermos fumadores y no fumadores así como en el 44% y 71% de estos subgrupos de sanos.

No se demostraron anticuerpos contra productos del condensado de humo en las condiciones en que se realizó la prueba

de CIEF (63). Estos resultados apoyan los informes sobre la alta frecuencia de los anticuerpos antitabaco en fumadores y no fumadores (68,75).

El antisuero antitabaco producido en conejos permitió de mostrar antígeno circulante en el suero del 44 y 41 % de los individuos enfermos fumadores y no fumadores respectivamente.

Los sujetos sanos fumadores tuvieron 53% de positividad contra el CH y los sujetos sanos no fumadores un 71%. En ambos grupos no se encontraron los antígenos de tabaco por pruebas de CIEF, aunque no se demostró la presencia del antígeno(s) de tabaco en el suero de estos individuos, los cuales están en - contacto con el antígeno de tabaco pero el número de años de consumo de cigarrillos es menor en relación a los pacientes enfermos fumadores.

Es importante resaltar que en los individuos sanos no se demostraron complejos inmunes tabaco-antitabaco ni tampoco se observó antígeno libre, lo cual indica la importancia de los antígenos del tabaco o de sus complejos inmunes como probables causantes de daño en diversas enfermedades. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios con técnicas como el inmunoensayo ó la inmunoelectrotransferencia que son más sensibles y que permiten discriminar la ó las clases de inmunoglobulinas antitabaco y la especificidad de los anticuerpos contra los antígenos del tabaco.

Los resultados permiten señalar la alta frecuencia de individuos con anticuerpos antitabaco, pero sólo aquellos que son

más susceptibles y que tienen complejos inmunes circulantes presentarán daño tisular teniendo en cuenta el número de años del consumo de cigarrillos y los problemas pulmonares a los que éstos sujetos se enfrentan. En general estos fumadores - tienen una incapacidad para eliminar agentes infecciosos que los pueden llevar a una muerte temprana (12,68,75,76,106,107). Los datos de los pacientes que obtuvimos difieren de los reportados por Romanski y col. (77,78,79) porque nuestra población es de pacientes con enfermedad pulmonar y Romanski y col estudiaron a pacientes con infarto del miocardio; además la obtención de los extractos del tabaco y las técnicas inmunoserológicas fueron diferentes (77,78,79). En relación a la respuesta inmune celular medida por la cantidad del factor inhibidor de la migración liberado por linfocitos de fumadores y no fumadores sanos expuestos a los antígenos del tabaco fue - similar en ambos grupos (8), lo que apoya que los productos contenidos en el humo de tabaco son capaz de inducir anticuerpos y respuesta inmune celular en un alto porcentaje de la población, aunque esta no fume activamente (8), sin embargo es posible que la presencia de complejos inmunes produzcan daño e hipersensibilidad celular.

Se ha expuesto al condensado de humo a un grupo de ratones durante 60 días, con una exposición diaria y se ha evaluado la presencia de anticuerpos antitabaco por la técnica de ELISA; los resultados preliminares señalan que estos ratones desarrollan una respuesta inmune humoral antitabaco (comuni-

cación personal Rodríguez G., U.M.E., Facultad de Medicina, U.N.A.M. 1986). Otros autores han informado sobre el efecto del tabaco en niños de padres fumadores, en los cuales hay un aumento en la susceptibilidad de padecer infecciones respiratorias repetidas (69,97), y en otros estudios se describen trastornos sobre la función respiratoria en no fumadores que están en contacto cercano con fumadores (52).

La concentración de IgA en suero, secreciones salivales y lavados bronquiales de fumadores enfermos estaba elevada además esta inmunoglobulina reaccionó con un antígeno viral (23,55). El humo de cigarrillos ejerce una acción supresora en la producción de IgA secretoria en sujetos sanos, pero no se modifica en sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (23). La presencia de IgA en los complejos inmunes obtenidos en pacientes ó animales experimentales se han demostrado in vivo e in vitro (28,47,73). En ratas se demostró la presencia de complejos inmunes que contenían IgA y estos fueron capaces de causar daño pulmonar en la rata (47). En pacientes también se ha observado una relación entre la presencia de IgA en los complejos inmunes de enfermos con daño glomerular y púrpura hemorrágica y existe el informe de un paciente que falleció a consecuencia de una miocarditis eosinofílica causada por la presencia de IgA en las arterias coronarias (28,47, 73).

En la población estudiada en este trabajo se encontró que la concentración de IgA en los complejos inmunes séricos no se presenta diferencia significativa entre fumadores y no fumadores, pero sí hay concentración mayor de IgA en los complejos inmunes de los enfermos comparados con la de los individuos sanos ($p < 0.001$).

Con objeto de establecer las características de los antígenos que participan en los complejos inmunes en el suero de la población estudiada se realizó electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS. Los enfermos fumadores y no fumadores tuvieron un promedio de 4 componentes, y en estos hay moléculas de antígenos del tabaco y de anticuerpos antitabaco, tomando en cuenta los pesos moleculares que van de 14 a 90 Kd. Los resultados en individuos sanos no difieren en el número de bandas obtenidas en fumadores y no fumadores, siendo el promedio de 6 bandas. En relación al número de bandas por electroforesis en geles de PA-SDS se observó que los enfermos tienen menor número de compuestos que los sanos ($p < 0.05$). La inmunoelectroforesis reveló un componente en la región de la albúmina, una en la región de las gammaglobulinas, y de 1 a 2 más - que corresponderían a otras proteínas del suero ó del tabaco, sin embargo se requiere un mayor análisis de estos componentes.

La presencia de antígenos y anticuerpos antitabaco en enfermos fumadores y no fumadores fue similar por CIEF, en las muestras precipitadas y evaluadas por la técnica II (ver material y métodos). Sin embargo es diferente en los sujetos sa-

nos fumadores y no fumadores que tuvieron menor porcentaje de positividad. Los complejos inmunes en pacientes tienen inmuno globulinas de clase IgA y posiblemente IgG por el estudio in- munoelectroforético. Además se observa la presencia de la albúmina que pudiera estar precipitándose inespecíficamente con los complejos inmunes. El hecho de que no se pudiera demostrar los complejos inmunes con las técnicas usadas ni tampoco el an tígeno de tabaco en su forma libre en los sujetos sanos, apoyan parcialmente la posibilidad de que estos, los complejos - inmunes y el antígeno de tabaco libre, pudieran tener cierto papel en el inicio y mantenimiento de la inmunopatología pulmonar, sin olvidar que se requiere otros factores para desencadenar las enfermedades pulmonares.

C O N C L U S I O N E S

- 1) Se demostró la presencia del antígeno del tabaco en el 80% y del anticuerpo antitabaco en 90% de los complejos inmunes formados in vitro.
- 2) Se comprobó en el suero la presencia del anticuerpo antitabaco en el 100% y del antígeno del tabaco en el 44% de pacientes con enfermedades pulmonares y tabaquismo positivo.
- 3) En pacientes con enfermedades pulmonares y tabaquismo negativo el 100% tuvieron en el suero anticuerpos antitabaco y el 41% tuvo antígeno de tabaco libre.
- 4) En los complejos inmunes aislados con polietilenglicol y disociados con ácido cítrico de pacientes con enfermedades pulmonares y fumadores el 72% tuvieron anticuerpos antitabaco y el Ag estuvo presente en el 100% de éste grupo y además se observaron 2 bandas.
- 5) El grupo de pacientes con enfermedad pulmonar y no fumadores de los cuales se aislaron complejos inmunes por polietilenglicol y fueron disociados con ácido cítrico, los anticuerpos antitabaco estuvieron presente en el 65% de los casos y el antígeno de tabaco en el 100%, con una sola banda en promedio.
- 6) El 43% de las personas sanas fumadoras tuvieron anticuerpos antitabaco y, en las no fumadoras el 71% fue positivo, no se encontró el antígeno del tabaco libre en el suero de los sujetos sanos.

- 7) Los sujetos sanos fumadores no tuvieron complejos inmunes
- 8) El contenido de IgA en los complejos inmunes de pacientes con enfermedades pulmonares fue mayor en relación con los individuos sanos tanto en fumadores como en no fumadores.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Albert R., Berger J., Sanbors K. and Lippmann M.: Effects of cigarette smoke components on bronchial clearance in the donkey. Arch. Env. Health 29: 96, 1974.
- 2) Antoniadis D., Niukian K., Schwartz J. and Shklar G.: Effects of smokeless tobacco on the immune system of syrian hamsters J. Oral Med. 39: 136, 1984.
- 3) Ballenger J.M.D., M.S.: Experimental effect of cigarette smoke on human respiratory cilia. New Eng. J. Med. 263: 832, 1960.
- 4) Barona P.A., Borunda O., Luna J., Ocaña H. y Quezada E.: Tabaquismo. Rev. Fac. Med. UNAM (México) 24: 6, 1981.
- 5) Becker C.G., Dubin T. and Wiedermann H.P.: Hypersensitivity to tobacco antigen. Proc. Natl. Acad.Sci. (U.S.A.) 73: 1712, 1976.
- 6) Becker C. and Dubin T.: Activation of factor XII by tobacco glycoprotein. J. Exp. Med. 146: 457, 1977.
- 7) Becker C.G., Levi R. and Zavec: Induction of IgE antibodies to antigen isolated from tobacco leaves and cigarette smoke condensate. Am. J. Pathol. 96: 249, 1979.
- 8) Bernal M.A. y Sonín M.: Efecto del tabaco sobre el sistema inmune. I. La producción del factor inhibidor de la migración de leucocitos en presencia de extracto de humo como antígeno en sujetos fumadores y no fumadores. Gaceta Médica Mexicana 117: 46, 1981.

- 9) Braval L. and Slomianski R.: Tabaquismo. Información Científica y Tecnológica. 3: 27, 1981.
- 10) Bridges R., and Stanley R.: Increased plasma concentrations of C9, C1 inhibitor and protease inhibitor associated with cigarette smoking. Life Sci. 11: 955, 1985.
- 11) Buist S., Nagy J. and Sexton G.: The effect of smoking cessation of pulmonary function: A 30-month follow-up of two smoking cessation clinics. Am. Rev. Resp. Dis. 120: 953, 1979.
- 12) Cano Valle F.: Tabaquismo. Rev. Fac. Med. (México). 27: 46, 1984.
- 13) Cohen A. and Cline M.: The human alveolar macrophage: Isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. J. Lab. Clin. Med. 50: 1390, 1971.
- 14) Connier Y., Belanger J. and Durand P.: Factors influencing the development of serum precipitins to farmer's lung antigen in Quebec dairy farmers. Thorax. 40: 138, 1985.
- 15) Contairs KC.: Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes, induced by cigarette smoking. Lancet 11: 1094, 1985.
- 16) Chávez Rivera I.: Cardioneumología y fisiopatología clínica. Editorial U.N.A.M. México, 1974.
- 17) Chu M., Parlett R.C. and Wright G.L.: A preliminary investigation of some immunologic aspects of tobacco use. Am. Rev. Resp. Dis. 102: 118, 1970.

- 18) Davis J.W.: Effects of and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. Clin. Pharmacol. Ther. 37: 529, 1985.
- 19) De la Cruz Ríos, J.L.: Bronchioalveolar lavage study of cellular and biochemical parameters in non-smokers and smokers. Med. Clin. 15: 842, 1985.
- 20) Dixon F.J., Vazquez J.J., Weigle W.D. and Cochrane C.G.: Pathogenesis of serum sickness. Arch. Pathol. 65: 18, 1958.
- 21) Dixon F.J.: The role of antigen-antibody complexes in disease. Harvery Lect. 58: 21, 1963.
- 22) Dixon F.J. and Kunkel H.G.: The biology and detection of immune complexes. Adv. Immunol. 28: 89, 1979.
- 23) Falk A., Okinaka A., and Siskind G.: Immunoglobulins in the bronchial washings of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Resp. Dis. 105: 14, 1972.
- 24) Festenstein H. y Démant P.: Immunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2. 1a. Edición Editorial: El Manuel Moderno. México, 1981.
- 25) Finch G.L., Fischer G.L., Hayes T.L. and Golde D.W.: Surface morfology and functional studies of human alveolar macrophages from cigarette smokers and nonsmokers. J. Reticuloendothel. Soc. 32: 1, 1982.
- 26) Fradkin V.A: Alergenos. 1a. Ed. Editorial: Mir. México, 1980.

- 27) Francus T., Siskin G., and Becker C.: Role of antigen structure in the regulation of IgE isotype expression. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 3440, 1983.
- 28) Galan J. and Timoney J.: Immune complexes in purpura haemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of Streptococcus EQUI¹. J. Immunol. 135: 3134, 1985.
- 29) Germuth F.C.: A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. J. Exp. Med. 97: 257, 1953.
- 30) Ghosh S.K., Gokani V.N. and Thakker M.: A preliminary aerobiological survey in a virginia tobacco farm during haversting. Indian J. Med. Res. 79: 566, 1984.
- 31) Ginns L.C., Goldenheim P.D., Willer L.G., Burton R.C. Gillick L., Colvin R.B., Goldstein G., Kung P.C. Hurwitz C. and Kozemi H.: T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. Analysis by monoclonal antibodies and flow citometry. Am. Rev. Resp. Dis. 126: 265, 1982.
- 32) Ginns L.C., Ryu H.J., Rogol R.P. and Sprince L.N.: Natural killer cell activity in cigarette smokers and asbestos workers. Am. Rev. Resp. Dis. 131: 831, 1985.
- 33) Gleich G.J. and Welsh P.W.: Immunochemical and physicochemical properties of tobacco extracts. Am. Rev. Resp. Dis. 120: 995, 1979.
- 34) Gravelle E.: Fumo ed oncogenesis. Min. Med. 73: 2349, 1982.
- 35) Green G.M., and Carolin D.: The depressant effect of cigarette smoke on the in vitro antibacterial activity of

- alveolar macrophage. New. Engl. J. Med. 276: 421, 1967.
- 36) Harkavy J.: Tobacco sensitization in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36: 381, 1937.
- 37) Harris H.: Tobacco sensitivity. Annals of allergy. 29: 608, 1971.
- 38) Harris J., Swenson E. and Johnson III J.: Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. J. Clin. Invest. 49: 2086, 1970.
- 39) Hawn C.V.Z. and Janeway C.A.: Histological and serological sequences in experimental hypersensitivity. J. Exp. Med. 85: 571, 1947.
- 40) Higenbottam T., Shipley M. and Rose G.: Cigarettes, lung cancer, and coronary heart disease: The effects of inhalation and tar yield. J. Epidemiol. Community Health. 36: 113, 1982.
- 41) Hoffmann D., Lavoise E. and Hecht S.: Nicotine: A precursor for carcinogens. Cancer Letters 26: 67, 1985.
- 42) Hopkin J.M. and Steel C.M.: Variation individual responses to the cytotoxicity of cigarette smoke. Thorax. 35: 751, 1980.
- 43) Hutchinson J.: The families of flowering plants. 2a. ed., Oxford University Press, P. 484, 1959.
- 44) Inman R.D. Redecha P.B., Knechtle J.J., Schuned E.S., Rijn, I.V. and Christian C.L.: Identification of bacterial antigens in circulating immune complexes of infective

- alveolar macrophage. *New. Engl. J. Med.* 276: 421, 1967.
- 36) Harkavy J.: Tobacco sensitization in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 36: 381, 1937.
- 37) Harris H.: Tobacco sensitivity. *Annals of allergy.* 29: 608, 1971.
- 38) Harris J., Swenson E. and Johnson III J.: Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* 49: 2086, 1970.
- 39) Hawn C.V.Z. and Janeway C.A.: Histological and serological sequences in experimental hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 85: 571, 1947.
- 40) Higenbottam T., Shipley M. and Rose G.: Cigarettes, lung cancer, and coronary heart disease: The effects of inhalation and tar yield. *J. Epidemiol. Community Health.* 36: 113, 1982.
- 41) Hoffmann D., Lavoise E. and Hecht S.: Nicotine: A precursor for carcinogens. *Cancer Letters* 26: 67, 1985.
- 42) Hopkin J.M. and Steel C.M.: Variation individual responses to the cytotoxicity of cigarette smoke. *Thorax.* 35: 751, 1980.
- 43) Hutchinson J.: The families of flowerins plants. 2a. ed., Oxford University Press, P. 484, 1959.
- 44) Inman R.D. Redecha P.B., Knechtle J.J., Schuned E.S., Rijn, I.V. and Christian C.L.: Identification of bacterial antigens in circulating immune complexes of infective

- endocarditis. J. Clin. Invest. 70: 271, 1982.
- 45) Jacobson B.: Women: Smokin's new victims. New Scientist 95: 506, 1981.
- 46) Janick J., Schery R.W., Wods F.W. and Ruttan V.W.: Plant science an introduction to world crops. 2a. ed. W. H. Freeman. and Co., San Francisco. P. 543, 1974.
- 47) Johnson K., Wilson B. and Ward P.: Acute lung injury in rat caused by immunoglobulin. A immune complexes. J. Clin. Invest. 74: 358, 1984.
- 48) Kew R., Ghebrehiwet B. and Janoff A.: Cigarette smoke can activate the alternative pathway of complement in vitro by modifying the third component of complement. J. Clin. Invest. 75: 1000, 1985.
- 49) Koop E.: Smoking and cancer. Hospital Practice. 14: 107, 1984.
- 50) Larson P.S., Haay H.B. and Silvette H.: Tobacco experimental and clinical studies. Williams and Wilkins Co. P. 553, 1961.
- 51) Lawrence H.M.G.: Taxonomy of vascular plants. 4a. ed. Macmillan. New York. P. 693, 1959.
- 52) Lefcoe N., Ashley M., Pederson L. and Keays J.: The health risks of passive smoking. Chest. 84: 90, 1983.
- 53) Lehrer S.B., Wilson M.R. and Salvaggio J.E.: Immunogenic properties of tobacco smoke. J. Allergy. Clin. Immunol. 62: 368, 1978.

- 54) Levi R.M.D., Zavec J.H., Burke J.A.M.S. and Becker C.G.:
Cardiac and pulmonary anaphylaxis in guinea pigs and rabbit
induced by glycoprotein isolated from tobacco leaves and
cigarette smoke condensate. *Am. J. Pathol.* 106: 318, 1982.
- 55) Lewis D., Lapp N. and Burell R.: Quantitation of secretory
immunoglobulin a chronic pulmonary disease. *Am. Rev. Resp.
Dis.* 101: 55, 1970.
- 56) Lisiewicz J. and Michalczak W.: Pharmacology an toxicology
of cigarette smoke. *Wiadomosci Lakarskie.* 36: 1339, 1983.
- 57) Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farh A.L. and Randall R.J.:
Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol.
Chem.* 193: 265, 1951.
- 58) Low R.: Protein biosynthesis by the pulmonary alveolar
macrophage: conditions of assay and the effects of cigarette
smoke extracts. *Am. Rev. Resp. Dis.* 110: 466, 1974.
- 59) Ludwig W.P., Schwartz A.B., Hoidal R.J.: Cigarette smoking
causes accumulation of polymorphonuclear leukocytes in
alveolar septum. *Am. Rev. Resp. Dis.* 131: 828, 1985.
- 60) Lynch G., Nightingale T.E., Ellis R.L. and Hoffman D.:
Constituents of tobacco smoke. In smoking and health a
report of the surgeon general. U.S. Government Printing
Office. Washington 1, 1979.
- 61) Martínez R.D. and Montfort I.: A study of the specificity
of alveolar macrophages antigens. *Immunology.* 25: 197,
1973.

- 62) Martínez R.D., Bialostosky D. y Bassoti R.: Estudio inmunoserológico en pacientes con infarto agudo del miocardio. I. Análisis inmunoserológico. Arch. Inst. Cardiol. (Méx.). 48: 414, 1978.
- 63) Martínez R.D., Pérez M.S., Saldua A. y Preciado A.: Actividad de lectina en extractos del tabaco y de otras solánaceas. XIV Congreso Nacional de Bioquímica. Guadalajara, Jal. p. 180, 1982.
- 64) Martínez R.D. y Preciado A.: La respuesta inmune humoral contra tabaco en individuos fumadores y no fumadores. Primera reunión de los alumnos de Maestría y Doctorado en Biomedicina. P. 112, 1982.
- 65) Mcleod R., Douglas G., Evans G., Campbell J., and Randee G.: Alveolar macrophage function and inflammatory stimuli in smokers with and without obstructive lung disease. Am. Rev. Resp. Dis. 131: 377, 1985.
- 66) Medici T.C.: Smoking pattern of smokers with and without tobacco smoke related lung diseases. Am. Rev. Resp. Dis. 131: 385, 1985.
- 67) Melendro L.E.: Respuesta inmune en la infección experimental por Nocardia brasiliensis. Tesis U.N.A.M. Facultad de Medicina. 1984.
- 68) Morales J.J.: Estudio inmunoserológico de los anticuerpos contra antígenos del tabaco y los complejos inmunes tabaco antitabaco en el infarto del miocardio. Tesis U.N.A.M. ENEP Zaragoza. 1984.

- 69) Pedreira F.: Involuntary smoking and incidence of respiratory illness during the first year of life. *Pediatrics*. 75: 594, 1985.
- 70) Peña M.J.: *Inmunología*, 1a. ed. Ed. Pirámide S.A., Madrid 1982.
- 71) Pérez-Tamayo R., Larralde C., Kretschmer R.: *Inmunopatología*. 1a. Ed. Editorial: La Prensa Médica Mexicana. México. 1976.
- 72) Phillips T.M., and Lewis M.G.: Detection of circulating immune complex by polyethylene glycol sedimentation and double current immunoelectrophoresis en Rosenberg, S.A. (ed). *Serologic analysis of human cancer antigens*. P. 701 Academic Press. 1980.
- 73) Popper H., Pongratz M. and Lanzer G.: IgA₂-alveolitis and eosinophilic pneumonia possibly virus triggered allergy. *Allergol. Immunopathol.* 10: 177, 1982.
- 74) Preciado A. y Martínez R.D.: Estudio inmunológico del tabaco. XIV Congreso Nacional de Bioquímica. Guadalajara, Jal. p. 179, 1982.
- 75) Preciado L.A.: El perfil antigénico del tabaco y el análisis de los anticuerpos contra antígenos del tabaco en el infarto del miocardio. Tesis. UNAM. Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud. 1983.
- 76) Rimpela H.A. and Rimpela M.: Increased risk respiratory symptoms in young smokers of low tar cigarettes. *Br. Med. J.* 18: 1461, 1985.

- 77) Romanski B. and Broda S.: The immunological response to tobacco antigens in the smoker. I. Specific precipitins against tobacco antigens in the serum of healthy cigarette smokers. *Allergol. Immunopathol.* 5: 659, 1977.
- 78) Romanski B., Broda S. and Swiatkowski M.: The immunologic responses to tobacco antigens in smokers. II. Specific precipitins against tobacco antigens in the serum of smokers suffering from coronary heart disease. *Allerg. Immunopathol.* 6: 383, 1978.
- 79) Romanski B., Broda S., Swiatkowski M., and Zbikowska-Gotz: The immunological response to tobacco antigens in the smoker. III. Type III hypersensitivity skin reactions and specific serum precipitins to four different tobacco extracs in patients suffering from coronary artery disease. *Allerg. Immunopathol.* 7: 187, 1979.
- 80) Romanski B., Broda S., Swiatkowski M. and Zbikowska-Gotz: The immunologic response to tobacco antigens in smokers. V. Plasma concentrations of immunoglobulin and some complement components in tobacco hypersensitivity patients suffering from coronary artery disease. *Allerg. Immunopathol.* 9: 847, 1981.
- 81) Romanski B., Zbikowska-Gotz, Kakol J. and Sinkiewicz W.: The immunologic response to tobacco antigens in smokers. VI. Phagocytosis of tobacco antigens by peripheral blood polymorphonuclear leucocytes studied by immunofluorescence. *Allerg. Immunopathol.* 12: 31, 1984.

- 82) Rose N.R., Bigazzi P.E.: Methods in Immunodiagnosis. Ed. Wileyu Son. New York, 1980.
- 83) Rostenberg I., Peñaloza R., Guízar J., Ciceron R., Olivares, A. y Armendares S.: Contenido anormal del carbohidrato de la IgG en fumadores asintomáticos. Rev. Invest. Clin. (Méx). 33: 45, 1981.
- 84) Roszman T. and Rogers A.: The immunosuppressive potential of products derived from cigarette smoke. Am. Rev. Resp. Dis. 108: 1158, 1973.
- 85) Saetta M.: Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. Am. Rev. Resp. Dis. 131: 764, 1985.
- 86) Scott N. De Silva R., Lown B. and Wurtman R.: Cigarette smoking in the 1970's: the impact of the antismoking campaign on consumption. Science. 211: 729, 1981.
- 87) Schuman L.M.: Introduction and summary in smoking and health a report of the surgeon general. Sec. I.U.S. Government Printing Office. Washington. 3, 1979.
- 88) Sjostrand M., and Rylander R.: Lung cell reactions in guinea pigs exposed to tobacco smoke and silica dust or bacterial lipopolisacarides. Toxicology. 29: 271, 1984.
- 89) Song D., Goldstein A., and Gohen G.: Smoking and health. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 10: 5, 1979.

- 90) Sordow R.A., Lenfan C.J.M., Frank S., Schweizer M. and Hurd S.S.: Nonneoplastic bronchopulmonary disease. In smoking and health a report of the surgeon general. U.S. Government printing Office Washington 1, 1979.
- 91) Stites D.P. Stobos J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.: Inmunología Básica y Clínica. 5a. ed. Ed. El Manual Moderno. México, 1985.
- 92) Stockley R. and Afford S.: The interaction of cigarette smoke solution with 1 antitrypsin: effect on inhibitory capacity, electrophoretic mobility and immunological measurement. Clin. Scien. 64: 223, 1982.
- 93) Sudan B. and Brouillard Ch.: Determination of nicotine in allergenic extracts of tobacco leaf by high-performance liquid chromatography. Chromatography. 288: 415, 1984.
- 94) Szundy E., Zsuzsa M., Fust G. and Székely J.: Serial measurement of circulating immune complexes in myocardial infarction. Br. Heart. J. 46: 93, 1981.
- 95) Tapia R.: Tabaquismo. Salud Pública (Méx). 22: 601, 1980.
- 96) Taylor R.G., Gross E. and Joycer H.: Smoking, allergy, and differential white blood cell count. Thorax. 40: 17, 1985.
- 97) Targer I.B. Muñoz A., Rosner B. and Weiss S.: Effect of cigarette smoking on the pulmonary function of children and adolescents. Am. Rev. Resp. Dis. 131: 752, 1985.

- 98) Thompson R.A.: La práctica de la inmunología clínica. 1a. edición. Editorial: El Manual Moderno. México, 1976.
- 99) Turk J.L.: Inmunología en medicina clínica. 1a. ed. Editorial: El Manual Moderno. México. 1972.
- 100) Turner M: Inmunología del pulmón. 1a. ed. Editorial: El Manual Moderno. México, 1981
- 101) Veta, S.: Studies on protein components, particularly secretory IgA, and free secretory component, in bronchoalveolar lavage fluids. Acta. Medica 40: 684, 1984.
- 102) Venable K.M., Topping M.D., and Howe W.: Interaction of smoking and atopy in producing specific IgE antibody against a hapten protein conjugate. Br. Med. J. 290: 201, 1985.
- 103) Villiger B., Broekelmann T., Kelley D., Heymach III. G.J. and MacDonald J.A.: Bronchoalveolar fibronectin in smokers and nonsmokers. Am. Rev. Resp. Dis. 124: 652, 1981.
- 104) Wadsworth C.: A microtechnique employing a gel chamber compared with other micro and macroplate technique for immunodiffusion. Int. Arch. Allergy. 21: 131, 1962.

- 105) Weber K. and Osborn M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406, 1969.
- 106) Weintraub W.S.: Importance of total life consumption of cigarettes as a risk factor for coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 55: 669, 1985.
- 107) Zaragoza J.R. y Llanos M.: *Tabaco y Salud*. 1a. Ed. Editorial: Ac. Madrid. 1980.