

15
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD ELASTOLITICA DE
MACROFAGOS ALVEOLARES Y MACROFAGOS DEL
INTERSTICIO PULMONAR EN COBAYOS EXPUESTOS
A HUMO DE CIGARRO**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a:

LILIA CARINA BECERRIL BERROCAL



México, D. F.



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) LILIA CARINA BECERRIL BERROCAL

con número de cuenta 8752549-8 con el Título: EVALUACION DE LA CAPACIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES Y MACROFAGOS DEL INTERSTICIO PULMONAR EN COBAYOS EXPUESTOS A HUMO DE CIGARRO.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
M. en C.	MARTHA	MONTAÑO RAMIREZ	<i>Martha Montañón</i>
Director de Tesis M. en C.	CARLOS RAMOS	ABRAHAM	<i>Carlos Ramos</i>
DR.	RAUL HUMBERTO	SANSORES MARTINEZ	<i>Raul Sansores</i>
M. en C.	LUISA ALBA	LOIS	<i>Luisa Alba</i>
Suplente M. en C.	MARIA DE LOURDES	SEGURA VALDEZ	<i>Maria de Lourdes</i>
Suplente			

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS,
DIVISION DE INVESTIGACION BIOMEDICA,
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR,
LABORATORIO DE FIBROSIS PULMONAR.**

A MI PADRE :

POR EL GRAN AFECTO QUE LE TENGO.

A MIS HERMANOS, CON MUCHO CARIÑO.

CON TODO MI AMOR A :

RICARDO

A MI PEQUEÑO TESORO :

RICKY

A la M. en C. MARTHA MONTAÑO RAMIREZ

por su valiosa ayuda, cooperación y solidaridad

durante el trabajo realizado para la presente tesis.

Al Dr. RAUL SANORES MARTINEZ

por su ayuda y asesoramiento para la realización

de esta tesis.

Al M. en C. CARLOS RAMOS ABRAHAM

por su ayuda en la elaboración de este trabajo.

INDICE

	pag.
I. INTRODUCCION.	1
1. ENFISEMA PULMONAR.	
1. 1. DEFINICION.	
1. 2. ANTECEDENTES.	2
2. CAUSAS DE ENFISEMA PULMONAR.	4
2. 1. ENFISEMA CAUSADO POR EL HABITO DE FUMAR CIGARROS.	
2. 2. EFECTOS QUIMICOS DEL HUMO DE CIGARRO.	5
2. 3. EFECTOS CELULARES DEL HUMO DE CIGARRO.	7
3. CELULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL ENFISEMA PULMONAR.	8
3. 1. PARTICIPACION DE LOS NEUTROFILOS.	
3. 2. PARTICIPACION DE LOS MACROFAGOS.	9
4. MODELOS ANIMALES DE ENFISEMA INDUCIDOS CON HUMO DE CIGARRO .	10

	pag.
5. ELASTINA.	15
5. 1. CARACTERISTICAS Y LOCALIZACION.	
5. 2. BIOQUIMICA DE LA ELASTINA.	
5. 3. SINTESIS DE LA TROPOELASTINA.	17
5. 4. DEGRADACION DE LA ELASTINA.	19
II. RECAPITULACION.	22
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS.	24
IV. MATERIAL Y METODOS.	26
1. EXPOSICION DE LOS ANIMALES AL HUMO DE CIGARRO.	26
2. PRUEBA DE CARBOXIHEMOGLOBINA.	28
3. OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES A PARTIR DE LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES.	29
4. OBTENCION DE MACROFAGOS INTERSTICIALES DEL PARENQUIMA PULMONAR.	31

	pag.
5. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA AJUSTAR EL NUMERO DE CELULAS.	32
6. ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS UTILIZANDO PLACAS CUBIERTAS CON ELASTINA³H.	33
7. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA CONTROLAR POSIBLES DIFERENCIAS CONDICIONADAS POR LOS METODOS.	35
7.1. NUMERO TOTAL DE MACROFAGOS / EXPERIMENTOS CON FICOLL.	35
7.2. ACTIVIDAD ELASTOLITICA CON Y SIN TRIPSINA.	37
8. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.	38

	pág.
9. CUANTIFICACION DE LA DESTRUCCION	
ALVEOLAR.	39
10. METODO ESTADISTICO.	40
V. RESULTADOS.	41
1. PRUEBA DE CARBOXIHEMOGLOBINA.	41
2. LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES (LBA).	41
3. PRUEBA DE VIABILIDAD EN CELULAS	
UTILIZANDO AZUL DE TRIPANO.	44
4. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.	44
5. CUANTIFICACION DEL INDICE DESTRUCTIVO.	51

	pag.
6. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES E INTERSTICIALES.	53
7. NUMERO TOTAL DE MACROFAGOS ALVEOLARES CON Y SIN FICOLI.	60
8. LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES TRATADOS CON Y SIN TRIPSINA DE COBAYOS EXPUESTOS A HUMO DE CIGARRO.	61
VI. DISCUSION.	62
VII. BIBLIOGRAFIA.	70

I. INTRODUCCION.

1. ENFISEMA PULMONAR.

1. 1. DEFINICION.

El enfisema pulmonar es una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se define en términos histológicos como una alteración del parénquima pulmonar, caracterizada por agrandamiento anormal y permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, acompañado por cambios destructivos en las paredes alveolares, con ausencia de fibrosis (1, 2).

Estos cambios resultan en la pérdida del intercambio de gases en la membrana alveolo capilar. Además, la destrucción del parénquima pulmonar provoca que los conductos aéreos se obstruyan durante la espiración, debido a la disminución de la retracción elástica. En los pacientes con esta enfermedad, la obstrucción puede ser desde leve a severa. La traducción clínica de esta obstrucción es una creciente disnea y limitación progresiva en la capacidad para llevar a cabo sus actividades diarias, originando la muerte a mediano plazo (2).

1. 2. ANTECEDENTES.

Desde los tiempos de Laennec, a principios del siglo XIX, había interés por investigar los mecanismos asociados a la destrucción y agrandamiento de los espacios aéreos. Sin embargo las primeras observaciones trascendentales ocurrieron en 1963 cuando Laurell y Eriksson reportaron una asociación entre la obstrucción crónica del flujo de aire y la deficiencia en suero de alfa-1-antitripsina y en 1964 Gross y asociados describieron el primer modelo reproducible de enfisema experimental en animales por inyección en los pulmones de proteasas de la planta de papaina. Estas dos observaciones, en forma independiente, marcaron las directrices que eventualmente llevarían a la conformación de la hipótesis del desequilibrio entre proteasas-antiproteasas, mediante la cual, se intenta explicar la patogénesis del enfisema pulmonar (3).

De acuerdo con esta hipótesis, el enfisema resulta de un aumento en la liberación de proteasas, de una reducción de las defensas de antiproteasas en el pulmón o una combinación de ambas, lo cual ocasiona daño pulmonar elastolítico. Se ha demostrado que es un requisito

esencial para las proteasas, tener la capacidad de degradar elastina, para que se produzca destrucción pulmonar (4).

Las proteasas que no actúan sobre la elastina no producen enfisema, aunque algunas pueden romper otros componentes de la matriz extracelular. Se ha observado que la degradación de la elastina en el pulmón es un factor central en la patogénesis del enfisema pulmonar (4).

Los neutrófilos, los macrófagos alveolares residentes, y los leucocitos mononucleares de la sangre y de los espacios alveolares, todos están implicados en la producción de elastasas del pulmón (5). Los inhibidores de proteasas, son los mejores medios de defensa del cuerpo contra el excesivo daño proteolítico que las elastasas pueden ocasionar en el pulmón y en particular contra las fibras de elastina. La mayoría de los inhibidores se encuentran circulando en el suero. La alfa-1-antitripsina, es un inhibidor de proteasas de serina, y tiene su máximo impacto en el metabolismo de elastina. Esta antiproteasa circula por todo el cuerpo a través de la sangre, protegiendo a las matrices extracelulares del ataque de la elastasa de neutrófilos o de otras proteasas (6).

La alfa-1-antitripsina es una glicoproteína con un peso molecular de 52 kd, que es sintetizada en el hígado y está

presenta en el suero a concentraciones que van de 1.8 mg/l a 2.0 mg/l (6). La difusión de esta proteína en el pulmón se considera por encima del 90%. Es una proteína muy estable, su función es inactivar, los complejos moleculares formados de todas las elastasas, con excepción de la elastasa de macrófagos (6).

Los individuos con deficiencia heredable de alfa-1-antitripsina, presentan una concentración de este inhibidor en la circulación que va del 10 % al 20%. Este defecto está frecuentemente asociado con el desarrollo temprano de enfisema aproximadamente en la cuarta o quinta década de vida de los individuos (7,8).

2. CAUSAS DE ENFISEMA PULMONAR

2. 1. ENFISEMA CAUSADO POR EL HABITO DE FUMAR CIGARROS.

Desde hace 25 años, se ha establecido que el tabaquismo es la principal causa de enfisema. Se ha identificado al humo derivado del cigarro como uno de los principales promotores para que ocurra un desbalance de proteasas-antiproteasas. El efecto del humo de tabaco en la elastina del pulmón

es extremadamente complicado, afectando algunas etapas del metabolismo del tejido conectivo (7).

2. 2. EFECTOS QUIMICOS DEL HUMO DE CIGARRO.

El humo de cigarro interfiere en la función local de los inhibidores de proteasas en el tejido pulmonar. El humo de cigarro contiene radicales libres, tanto en la fase gaseosa como en la fase solida (9).

En la fase de gas existen radicales inorgánicos como el óxido de nitrógeno, que es fuente de radicales orgánicos(9). Incluidos en estos radicales orgánicos estan los de carbono y los de oxígeno por ejemplo el superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo, que son altamente reactivos. La alfa-1-antitripsina puede ser inactivada "in vitro" por los radicales libres de oxígeno derivados del humo de cigarrillos (9). El primer punto de inactivación por oxidación de la alfa-1-antitripsina, se ha demostrado que se da en el sitio activo del residuo de metionina, que se encuentra en la posición 358 en la secuencia de la proteína. Disminuyendo de 1000 a 2000 veces su actividad inhibitoria contra la elastasa de neutrófilos, que es una de las

principales elastasas involucradas en el desarrollo del enfisema pulmonar (2,10).

Los oxidantes del humo de cigarro pueden causar daño directo a macromoléculas de la matriz del tejido conectivo, por rompimiento de enlaces covalentes en las moléculas, haciéndolas más susceptibles a proteólisis. El humo de cigarro puede suprimir los componentes de la síntesis de elastina en el pulmón, específicamente de los enlaces cruzados de moléculas precursoras solubles. Los experimentos "in vitro" sugieren que la afinidad de la elastina soluble para los enlaces cruzados por la enzima lisil oxidasa, disminuyen después de la exposición al humo del tabaco (11).

Otro de los efectos patológicos potenciales de estos agentes oxidantes es la alteración química de lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y cofactores. Recientemente se han publicado evidencias de que estos agentes oxidantes afectan moléculas antioxidantes del pulmón, tales como la ceruloplasmina, vitamina C y metionina superóxido-péptido reductasa (6).

Por otro lado, el alquitrán contiene más de 10^{10} radicales libres por gramo. El principal radical libre ha sido identificado como una quinona-hidroquinona. Este compuesto

se almacena en el alquitrán, y es semejante a los tipos de radicales oxidantes de la fase de gas, este polímero de quinona-hidroquinona, es un activo sistema redox, que es capaz de reducir el oxígeno molecular y producir peróxido, eventualmente dejando el hidrógeno del peróxido y radicales hidroxil, ocasionando un ambiente altamente oxidante en el pulmón (11).

2.3. EFECTOS CELULARES DEL HUMO DE CIGARRO.

La inhalación del humo de cigarro induce acumulación en los bronquiolos respiratorios de macrófagos alveolares, que aparecen metabólicamente activados. Los macrófagos activados tienen la capacidad de secretar quimioatrayentes para neutrófilos (12). El resultado final es la migración de células al pulmón, con lo cual se incrementa la producción potencial de elastasas en el órgano.

Tanto los neutrófilos como los macrófagos pueden estar relacionados con la destrucción de la elastina del pulmón en fumadores. La mayoría de los investigadores han intentado probar la importancia de una u otra célula. La actividad elastolítica de los neutrófilos está mucho mejor entendida que la de los macrófagos alveolares (4). Esto ha ocurrido

porque los neutrófilos contienen grandes cantidades de elastasa de serina que se ha aislado para caracterizarla, mientras que a los macrófagos humanos se les ha asociado poca actividad elastolítica.

3. CELULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL ENFISEMA PULMONAR.

3. 1. PARTICIPACION DE LOS NEUTROFILOS.

El enfisema ha sido producido en animales por inyección intratraqueal de homogenados de neutrófilos humanos. La elastasa de neutrófilos parece ser el más importante constituyente de estas preparaciones. Los granúlos azurofílicos de los neutrófilos contienen elastasa en niveles altos (3 ug/1,000,000 de células). Esta elastasa es una glicoproteína de 29 KD, y es una poderosa proteasa producida en la médula osea, en los promielocitos durante el proceso de diferenciación de los neutrófilos (13). Cuando los neutrófilos son activados o lisados, la elastasa es liberada en el espacio extracelular, y puede romper elastina, que es una proteína crítica para mantener el recorrimiento elástico de la pared alveolar. Sin embargo la elastasa de neutrófilos, puede romper también tejido

conectivo, componentes de las paredes alveolares, incluyendo a las colágenas tipo I, II y IV, fibronectina, componentes de proteoglicanos. Por esta razón una disminución en la cantidad del inhibidor de la elastasa de neutrófilos, causa destrucción progresiva de las paredes alveolares. Estas células se han considerado como participantes activos de diversos procesos patológicos más que de procesos normales, tal es el caso del enfisema pulmonar (14,15).

3. 2. PARTICIPACION DE LOS MACROFAGOS.

Sin embargo, existe un incremento en la población de macrófagos presentes en los pulmones de los fumadores, y hay un claro predominio de estos en los primeros sitios de daño al pulmón inducido por el humo de cigarro. El papel directo de los macrófagos alveolares en el desarrollo del enfisema no ha sido bien establecido. En contraste con los neutrófilos, una inyección intratraqueal de homogenados de macrófagos no produce enfisema. Sin embargo los macrófagos alveolares así como el humo de tabaco, son fuente rica de agentes oxidantes y radicales libres de oxígeno; y sintetizan una elastasa diferente a la elastasa de las células polimorfonucleares, que no es una proteasa de

serina, si no una metaloendopeptidasa (16). Algunos macrófagos alveolares, cuando son cultivados, secretan facilmente cantidades medibles de metaloproteinasas del tipo elastasas no inhibidas por la alfa-1-antitripsina. Las características bioquímicas de las elastasas de los macrófagos alveolares humanos no han sido bien determinadas (4).

TABLA No. 1

FUNCIONES DE LOS MACROFAGOS PULMONARES.

Secreción de proelastasas
Secreción de elastasas activas
 Metaloelastasas
 Cisteín-elastasas
 Serín-elastasas (neutrófilos)
Inactivación de α_1 -Antitripsina
Oxidación por radicales libres de oxígeno
Proteólisis por metaloelastasas
Quimiotaxis de neutrófilos
Estimulación de la síntesis de elastasa por neutrófilos
Incremento de la actividad elastolítica
Secreción de inhibidores de elastasas
 α_1 -Antitripsina
 α_2 -Macroglobulina
Secreción de TIMP

Los macrófagos alveolares pueden fagocitar elastasas de neutrófilos por medio de receptores específicos y liberarlas posteriormente en forma activa. Además pueden promover la actividad elastolítica por liberación de varios tipos de elastasas, por inactivación de la alfa-1-antitripsina, y por reagrupar neutrófilos en los pulmones, estimulando la liberación de elastasas (4).

Algunos estudios sobre degradación de matriz extracelular por macrófagos alveolares (17,28), han demostrado que los macrófagos alveolares pueden degradar elastina en un medio que contiene suero, y que se necesita del contacto de las células con el sustrato de elastina para degradar esta proteína. Además se observó que la actividad elastolítica está dada por las metaloproteasas y un poco por las proteinasas de serina o cisteína (17).

Además se ha observado que bajo ciertas circunstancias, altas concentraciones de inhibidores de proteasas no pueden proteger a la matriz de la actividad proteolítica de estas células. Parece que la falta de protección ocurre porque, las células inflamatorias pueden adherirse estrechamente a la matriz, evitando el líquido que contiene el inhibidor, además las células inflamatorias generan oxidantes que inactivan a los inhibidores de proteasas (18). Toda esta información ha sido recabada, de estudios realizados con

macrófagos alveolares colectados de lavados bronquialveolares. Pero es posible que los macrófagos alveolares no representen a todos los macrófagos del pulmón (19). Para comprender lo que sucede en la patogénesis del enfisema pulmonar, es necesario analizar las demás células pulmonares en especial la población de macrófagos intersticiales.

Algunos estudios recientes se han enfocado al estudio de los macrófagos del intersticio pulmonar. En ellos analizan los aspectos morfológicos y funcionales para poderlos distinguir de los macrófagos alveolares. Los macrófagos intersticiales se encuentran en el tejido conectivo del pulmón, y en contraste con los macrófagos alveolares, no están directamente expuestos a las partículas que lleva el aire. Estos macrófagos intersticiales son obtenidos de fragmentos de pulmón picado y no de lavado bronquialveolar (19).

A pesar de algunas semejanzas con los macrófagos alveolares (fagocitosis, liberación de radicales libres de oxígeno, y la presencia de receptores para fragmentos de inmunoglobulinas G IgG), los intersticiales tienen incrementada la capacidad de replicarse y sintetizar ADN "in vitro" comparada con los macrófagos alveolares. Es probable que los macrófagos del intersticio pulmonar, debido a su mayor proximidad con el tejido conectivo de la matriz pulmonar,

tengan mayor relevancia en el desarrollo del enfisema pulmonar. Además pueden existir algunas diferencias funcionales entre ambos tipos de células que pueden hacer más o menos importante la actividad de uno u otro tipo de célula.

4. MODELOS ANIMALES DE ENFISEMA INDUCIDOS CON HUMO DE CIGARRO.

Los modelos animales de enfisema se han limitado a la instilación de elastasas o a la exposición de gases y humo. El dato de la exposición al humo de cigarrillos ha permitido reproducir consistentemente la destrucción del pulmón enfisematoso que se observa en humanos fumadores.

Wright y Churg en 1990, usando un modelo experimental con cobayos expuestos a 10 cigarrillos al día, por periodos de 1 mes, 3 meses y 12 meses, reportaron cambios morfológicos y fisiológicos en los pulmones de los cobayos, que corresponden a la definición de enfisema. Ellos encontraron que en los animales expuestos por un mes, el agrandamiento de los espacios aéreos es bajo, en comparación con los controles. Sin embargo en los animales expuestos al humo de

cigarro por 12 meses, el agrandamiento de los espacios aéreos es del 150 % en comparación con los controles. Además cuando fué subdividido el parénquima pulmonar, en los componentes morfológicos, la dilatación estuvo presente tanto en los alveolos, como en los conductos alveolares. Estos datos sugieren que la exposición al humo de cigarro, altera el desarrollo del pulmón y causa destrucción del tejido pulmonar (20).

Este modelo, obviamente no es una replica exacta de las condiciones en que se da el enfisema humano; sin embargo muestra los cambios morfológicos y fisiológicos en el enfisema de cobayos, con una exposición crónica al humo de cigarro y provee a la investigación una aproximación de los mecanismos de destrucción pulmonar, causada por el humo de cigarro.

5. ELASTINA.

5. 1. CARACTERISTICAS Y LOCALIZACION.

La elastina es una proteína que proporciona elasticidad, que permite extensibilidad o estiramiento rápido y recuperación elástica cuando es requerido (6). Esta proteína es el componente funcional de las fibras elásticas.

La fibra de elastina se presenta virtualmente en todos los vertebrados, aunque sólo está dentro de algunos tejidos, como las arterias, algunos ligamentos y el pulmón (17). En el intersticio pulmonar, la degradación y resíntesis de la elastina aparece como un importante mecanismo biológico. En particular, la pérdida progresiva de elastina generalmente lleva al desarrollo de enfisema (15).

5. 2. BIOQUIMICA DE LA ELASTINA.

Es importante destacar que las fibras de elastina o componente amorfo, se constituyen de una sola proteína polimérica la elastina (denominada tropoelastina en su forma de precursor soluble). Las fibras elásticas del pulmón,

probablemente son las moléculas que determinan fundamentalmente su elasticidad bajo presiones fisiológicas (21).

Las fibras elásticas son oblicuas al pulmón y como en otros órganos, se asocian con colágena y proteoglicanos de la matriz extracelular. La elastina que fué el primer componente purificado de las fibras elásticas, es una proteína con enlaces covalentes intermoleculares altamente resistentes, aún cuando se someta a procesos de extracción bastante drásticos (22). Esta proteína elástica es altamente insoluble en agua debido a su composición de residuos de aminoácidos.

Aproximadamente un 33% de los residuos de aminoácidos de la elastina son de glicina, del 11% al 14% de prolina, del 1% al 2% de 4-hidroxiprolina, 40% de aminoácidos hidrofóbicos como la alanina, valina, leucina, isoleucina y fenilalanina. Considerando la polaridad de los aminoácidos totales, un 95% son hidrofóbicos y solamente el 5% son hidrofílicos, lo que explica la alta insolubilidad de esta proteína (23,24).

Es importante destacar la presencia característica de dos aminoácidos derivados de la lisina: la isodesmosina (Ide) y la desmosina (Des), que constituyen los enlaces covalentes

intermoleculares maduros de las fibras de elastina. Cada residuo de Des o de Ide enlaza covalentemente dos moléculas de tropoelastina.

5. 3. SINTESIS DE LA TROPOELASTINA.

La biosíntesis de la tropoelastina, el precursor soluble de las fibras de elastina, se ha demostrado en fibroblastos, células musculares lisas, condrocitos y células endoteliales (9,19). En el caso del pulmón las células responsables de este proceso son varias dependiendo de la localización anatómica. Los condroblastos auriculares producen la elastina en los tejidos cartilagineos de la tráquea y bronquios del tronco principal; las células mesoteliales de la pleura sintetizan la proteína en esta estructura; las células musculares lisas producen y organizan la elastina en la vasculatura pulmonar (22).

En el caso de la elastina del parénquima pulmonar, no se han identificado las células responsables de su síntesis. Esto es debido en parte, a que esta zona del pulmón contiene diversos tipos de células potencialmente responsables. Además el fenotipo de las células intersticiales se modifica con el desarrollo, y esto interfiere con la identificación

precisa. Cuando los tabiques alveolares comienzan a formarse, los miofibroblastos que se encuentran en contacto estrecho con las estructuras capilares, se han considerado como la fuente de elastina en estos sitios. En el pulmón de rata, las células intersticiales inmaduras se diferencian en fibroblastos llenos de lípidos y en fibroblastos no llenos de lípidos, siendo estos últimos, los miofibroblastos del tabique alveolar, encargados de la síntesis de elastina en el intersticio. Se ha reportado que los fibroblastos pulmonares intersticiales de rata neonatal, son capaces de sintetizar elastina en condiciones de cultivo (25,26).

Una vez que se activa el gene de la tropoelastina, se inicia la transcripción, en alguno de los siete sitios de iniciación del gene humano. El RNA mensajero llega a los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso (RER), es traducido y migra hacia el interior de las cisternas del RER, guiado por su peptido señal. La tropoelastina ya traducida, con un peso de aproximadamente 75,000 daltones es secretada hacia el espacio extracelular, las moléculas de tropoelastina se integran con las microfibrillas para que mediante la fibrilogénesis se formen las fibras elásticas (24,27).

Después de que la célula ha secretado las moléculas de tropoelastina, ocurre una asociación entre estas moléculas con las microfibrillas. En este momento ocurre la interacción hidrofóbica, que induce la presumible coacervación de las moléculas de tropoelastina, para que posteriormente la enzima peptidil-lisil-oxidasa catalice la conversión de 5 o 6 residuos de lisina, en al-lisina en cada molécula de tropoelastina. Después los residuos de al-lisina se condensan, y posteriormente se forman los enlaces covalentes por condensación de aldol, hasta la formación de Ide y Des, que son los enlaces maduros en la fibra de elastina (28,27,26,29).

La organización de la fibra elástica funcional es un proceso complejo, que incluye la interacción de la tropoelastina con las glicoproteínas de las microfibrillas. Pero no se conoce como ocurre esta interacción.

5. 4. DEGRADACION DE LA ELASTINA.

Se ha demostrado que la producción de elastina declina con la edad, y con el incremento de duplicaciones celulares. Los estudios sobre degradación de elastina, muestran que la reconstrucción de una fibra de elastina es un proceso extremadamente lento.

Los estudios en humanos, usando técnicas inmunológicas para medir péptidos de elastina en la sangre o desmosina excretada en orina, sugieren que menos del 1% del total de elastina del cuerpo humano se renueva al año (30).

El mecanismo de la degradación de elastina "in vivo", puede ser dividido en 2 categorías diferentes: la de enzimas que degradan a la molécula soluble de tropoelastina; y la de enzimas que hidrolizan la elastina polimérica, que forma parte de las fibras elásticas maduras e insolubles.

La tropoelastina es degradada por diversas proteasas, conocidas como tropoelastinasas: tales como la elastasa; la tripsina; la quimiotripsina; la pronasa; la termolisina; la catepsina G; la trombina y la Kalikreina (6).

La elastina fibrilar entrelazada por enlaces covalentes de Des e Ide, es susceptible de hidrólisis por un grupo selecto de enzimas que han sido clasificadas como elastasas. Estas enzimas son derivadas por diferentes fuentes incluyendo el páncreas (23), neutrófilos (24), macrófagos (25), monocitos (26), plaquetas, células musculares lisas y fibroblastos (27).

Aunque estas han sido designadas como elastasas, no son específicas, ya que se ha visto que pueden cortar por la parte central moléculas de proteoglicanos, colágena tipo III

y tipo IV, fibronectina, y algunas proteínas del plasma (6).
El papel de estas enzimas en el metabolismo normal de la elastina es difícil de determinar.

II. RECAPITULACION.

Aunque en la actualidad la hipótesis más aceptada para explicar la patogénesis del enfisema es el desequilibrio proteasas-antiproteasas, el papel que desempeñan algunas células inflamatorias no está totalmente aclarado. La actividad elastolítica de los neutrófilos y su presencia en los espacios alveolares y en la sangre periférica, los señala como una de las más importantes. Sin embargo los neutrófilos no son las únicas células en la luz alveolar y además la elastasa derivada de estos, es fácilmente inhibida por la alfa-1-antitripsina. Por otro lado, los macrófagos alveolares que contienen una considerable cantidad de enzimas elastolíticas, que no son afectadas por la alfa-1-antitripsina, son las células que se encuentran en mayor número en el lavado bronquioalveolar de fumadores. De ahí que en los años recientes un grupo de investigadores, ha dedicado su atención al estudio de la actividad elastolítica de los macrófagos alveolares. La mayoría de estos estudios se ha realizado en macrófagos derivados de la luz alveolar, recuperados de lavados bronquioalveolares. Sin embargo, es probable que los macrófagos del intersticio pulmonar, debido a su mayor proximidad con el tejido conectivo de la matriz pulmonar, tengan mayor relevancia en la patogénesis del

enfisema. Por lo tanto, puede ser importante comparar las actividades enzimáticas de los macrófagos alveolares y los macrófagos intersticiales con el objeto de evaluar posibles mecanismos patogénicos en la producción de enfisema.

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS.

OBJETIVOS:

- 1.- Comparar la actividad elastolítica de macrófagos alveolares con la de macrófagos intersticiales en cobayos expuestos al humo de cigarro.

- 2.- Comparar la actividad elastolítica de macrófagos alveolares de cobayos expuestos al humo de cigarro, con la actividad elastolítica de macrófagos alveolares de cobayos controles no expuestos al humo de cigarro.

- 3.- Comparar la actividad elastolítica de macrófagos intersticiales de cobayos expuestos a humo de cigarro, con la actividad elastolítica de macrófagos intersticiales de cobayos controles no expuestos al humo de cigarro.

HIPOTESIS:

1.- La actividad elastolítica de los macrófagos alveolares es de igual magnitud que la de los macrófagos intersticiales.

2.- La actividad elastolítica tanto de los macrófagos alveolares como de los intersticiales, de los cobayos expuestos al humo de cigarro es mayor en comparación con la de los macrófagos de cobayos no expuestos al humo de cigarro.

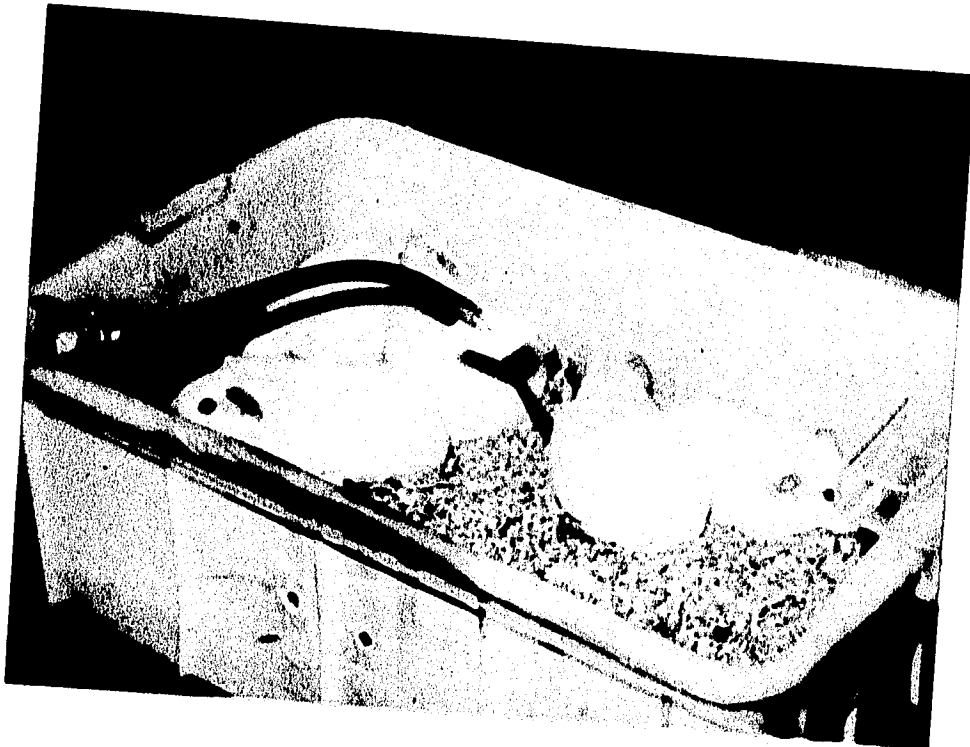
IV. MATERIAL Y METODOS.

1. EXPOSICION DE LOS ANIMALES AL HUMO DE CIGARRO.

Un grupo de 7 cobayos machos de 4 meses de edad, con pesos iniciales de 600 g a 650 g, fueron expuestos a humo de cigarro, con la siguiente dosis: 20 cigarros comerciales sin filtro al día, por espacio de 4 hrs, durante 6 semanas. Otro grupo de 7 cobayos de la misma edad, peso y sexo no expuestos a humo de cigarro fueron usados como controles.

El dispositivo empleado para la exposición de los animales al humo de cigarro, comprendía una caja de acrílico de 80 cm de largo X 40 cm de ancho X 30 cm de altura, en donde se colocaban los cobayos. Esta se sellaba perfectamente con una tapa de acrílico. La caja presentaba dos orificios por donde se introducían los cigarros que desprendían el humo. Además en la tapa se encontraba un orificio por donde entraba aire, y enseguida se encontraba otro orificio conectado al vacío por medio de una manguera de látex. Todo el dispositivo se instaló dentro de una campana de extracción.

MODELO DE EXPOSICION DE LOS ANIMALES AL HUMO DE CIGARRO.



2. PRUEBA DE CARBOXIHEMOGLOBINA.

En un experimento paralelo, a 5 cobayos expuestos por un día al humo de 20 cigarros por espacio de 4hrs y a 2 cobayos no expuestos, se les sacrificó para tomar muestras de sangre arterial, a la que se le adiciono heparina. Las jeringas que contenian las muestras de sangre se colocaron en hielo. El porcentaje de carboxihemoglobina se midio en un Co-oxímetro.

3. OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES A PARTIR DE LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES.

Al término del intervalo experimental de exposición al humo de cigarro, los animales experimentales y control fueron anestesiados con éter etílico.

Posteriormente, a cada animal tanto patológico como control se le afeito la región del cuello y se hizo una traqueostomía con los métodos asépticos y antisépticos convencionales. Por vía intratraqueal, se les realizaron 5 lavados bronquioalveolares (LBA). En cada lavado se les instilaron alícuotas de 10 ml de NaCl (0.15 M estéril a

37°C). Los lavados se recuperaban en tubos estériles y eran colocados en hielo.

El líquido obtenido de los LBA se centrifugó por 10 minutos a 1,500 rpm y a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se eliminó y el botón obtenido se resuspendió con 5 ml de medio de cultivo (RPMI 1640) sin suero. Después, a una pequeña muestra de esta solución, se le adicionó una gota de azul de tripano para medir viabilidad de células. Esta muestra fue colocada en una cámara de Neubauer (Hemocitómetro con cobertura de vidrio). La cámara de Neubauer se observó en un microscopio de luz Carl Zeiss, para llevar a cabo el conteo de los macrófagos presentes por mm^2 . Se consideraron como macrófagos solo a las células que eran de mayor tamaño en comparación con las demás células.

Después se calculó el número total de macrófagos presentes en los 5 ml de medio, de la siguiente forma.

Fórmula:

$$CTM \times 10,000 = R$$

$$R \times \text{ml/b}$$

DONDE:

- 1) CTM es la cuenta total de macrófagos en la superficie visualizada de 1 mm².
- 2) El recuento total de macrófagos se multiplicó x 10,000 ya que 1ml = 1cm³ = 1,000 mm³ = 10,000 cuadros grandes de 0.1 mm³.
- 3) R es el resultado de la multiplicación.
- 4) ml/b son los mililitros que se utilizaron para resuspender el botón.

4. OBTENCION DE MACROFAGOS INTERSTICIALES DEL PARENQUIMA PULMONAR.

Para este fin se extrajeron los dos pulmones del cobayo, y el pulmón izquierdo se colocó en una solución de formol al 10 % para el estudio morfológico, el pulmón derecho se depositó en una caja de petri estéril.

El tejido en fresco se cortó con unas tijeras en pequeños fragmentos de 1 mm aproximadamente, agregándosele 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 sin suero, y 5 ml de tripsina EDTA (1X) SIGMA. Esto se incubó por 20 minutos en una estufa metabólica GCA/PRECISION SCIENTIFIC con agitación, a 37°C. Al término de la incubación, se agregaron 5 ml de medio RPMI con suero al 10 %, para detener la reacción enzimática. El homogenado se filtró a través de 3 capas de gasa estéril, para retirar el exceso de tejido. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1,500rpm y a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió con 5ml de medio RPMI con suero al 10%. En un tubo para cultivo de células se colocaron 5 ml de ficoll (Lympho-paque con densidad de $1.086 \pm 0.002\text{g/ml}$). Después se dejó caer lentamente con una pipeta pasteur, el botón resuspendido en medio RPMI, formándose al término dos fases. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1,500 rpm y a una

temperatura de 4°C. Se extrajo cuidadosamente el halo formado entre las dos fases donde se encontraban separadas las células mononucleares, y se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, el botón obtenido se resuspendió en 3ml de medio RPMI que contenía el 10% de suero fetal bovino. De esta suspensión se tomó una alícuota y se le agregó una gota de azul de tripano para medir viabilidad. Otra muestra de esta misma suspensión fue colocada en una cámara de Neubauer, y se observó al microscopio para la cuenta de macrófagos por mm³.

El número de macrófagos contados, fue ajustado a un millón por ml de medio de cultivo RPMI con el 10 % de suero fetal bovino.

5. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA AJUSTAR EL NUMERO DE CELULAS.

Para ajustar el número de macrófagos a un millón por ml, se centrifugan nuevamente las células, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el botón en los ml necesarios de medio de cultivo RPMI con suero al 10 %, obteniendo así aproximadamente un millón por ml de medio de cultivo. De esta solución de células se tomó una pequeña muestra y se

realizaron frotis tanto del lavado bronquialveolar como de las células obtenidas de tejido, para llevar a cabo un conteo de todas las células presentes.

6. ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS UTILIZANDO PLACAS CUBIERTAS CON ELASTINA³H.

Este ensayo se realizó de acuerdo a la técnica de Chapman y cols. (33).

Una suspensión de elastina tritiada (obtenida de ligamento de nuca de bovino) se depositó de manera uniforme sobre cajas de cultivo (Cluster COSTAR) de 24 pozos (el diámetro de cada pozo es de 16 mm). Colocándose en cada pozo 15 ul de elastina tritiada, tomando en cuenta que 1 ul de elastina en solución contenía 24 ug de elastina tritiada. Las cajas fueron secadas a 45°C por espacio de 24hrs.

En cada pozo se sembró una muestra de 1 ml de la suspensión previamente ajustada, a un millón de macrófagos por ml de medio RPMI con 10% de suero fetal bovino. Cada muestra obtenida de LBA y de tejido se ensayó por triplicado.

Las cajas sembradas se incubaron por espacio de 2hrs a 37°C. Una vez completado este intervalo de tiempo, se retiró el medio suspendido de los pozos de las cajas, eliminando de esta manera a las células remanentes no adheridas. Después se adicionó medio fresco RPMI con suero 10%, y se dejaron incubando a 37°C durante 24hrs, 48hrs, y 72 hrs. Tomando en cada intervalo de tiempo el medio suspendido, y adicionando medio fresco nuevamente.

Como controles se ensayaron pozos con medio RPMI, con suero al 10 %, sin muestra de células. Dándoles el mismo tratamiento que a los pozos sembrados con células.

Para determinar la actividad elastolítica de los macrófagos cultivados, se midió la elastina tritiada liberada al medio. Las muestras obtenidas se centrifugaron por 10 minutos, en una microfuga-E Beckman; del sobrenadante se tomó una alícuota de 75 ul y se homogenizó en 10 ml de líquido de centelleo. La radiactividad fue determinada en AQUASOL-2 , en un contador de centelleo líquido (Beckman LC 100C).

La actividad específica se obtuvo contando la cantidad de radiactividad cpm que contenía una muestra de 15 ul de elastina marcada con tritio radiactivo y homogenizada en 10 ml de AQUASOL-2, en un contador de centelleo líquido

(Beckman LC 100C), donde se obtuvieron 243,423 cpm en 360 ug de elastina marcada, en base en este resultado se calculó la cantidad de elastina degradada.

Los resultados de la actividad elastolítica, fueron expresados en : ug de elastina degradada / un millón de macrófagos.

7. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA CONTROLAR POSIBLES DIFERENCIAS CONDICIONADAS POR LOS METODOS.

7.1. NUMERO TOTAL DE MACROFAGOS / EXPERIMENTOS CON FICOLL.

Para saber si el número total de células varía cuando se utiliza ficoll (Lympho-paque con densidad de 1.086 ± 0.002 g/ml) en la obtención de macrófagos; a un grupo de 3 cobayos expuestos al humo de 20 cigarros diarios durante 6 semanas, se les realizaron 5 lavados bronquialveolares (LBA) con solución salina en las condiciones ya descritas anteriormente. Los LBA fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, el botón obtenido se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 sin suero, una pequeña muestra de esta solución se

observó al microscopio en una cámara de Neubauer, para el conteo de células por mm^2 . Posteriormente se calculó el número total de células en los 5 ml de medio de cultivo y se ajustó a un millón de células por mililitro.

Después en un tubo de 15 ml se colocaron 5 ml de ficoll, y se dejó caer lentamente con una pipeta pasteur la mitad de medio de cultivo con las células resuspendidas ya ajustado a un millón de células por ml, esto se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C , al término se extrajo el halo formado entre las dos fases, y se centrifugó nuevamente a 1500 rpm 10 minutos a una temperatura de 4°C , el botón obtenido se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo sin suero, una pequeña muestra de esta solución se observó al microscopio en una cámara de Neubauer, para el cálculo de células por mm^2 . Posteriormente se comparó el número de células obtenidas usando ficoll y el número de células cuando este no es utilizado.

7.2. ACTIVIDAD ELASTOLITICA CON Y SIN TRIPSINA.

Para la extracción de los macrófagos del intersticio pulmonar, fué necesario utilizar tripsina, pero se desconocía cuanto podría estar influyendo esta proteasa en la actividad proteolítica de los macrófagos, por ello se hizo un ensayo paralelo con los macrófagos alveolares, ya que para la extracción de estos no se utilizó tripsina.

A un grupo de 3 cobayos expuestos al humo de 20 cigarrillos diarios durante 6 semanas, se les realizaron 5 lavados bronquialveolares a cada animal, de estos lavados se obtuvo el total de células, bajo los métodos y condiciones ya descritos anteriormente. Una vez que se tenía ajustada la suspensión de células en el medio de cultivo sin suero, a un millón por ml se tomó la mitad, y se le dió el tratamiento enzimático de la siguiente forma, por cada 4 ml de medio se le adicionó 1 ml de tripsina EDTA, esto se dejó incubar 20 minutos de la misma forma como se hacía para la extracción de los macrófagos intersticiales, después se detiene la reacción adicionando 2 ml de medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino al 10%, se centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4°C, y el botón obtenido se resuspende con medio de cultivo RPMI con suero.

Una vez ajustada esta solución a 1 millón de células por ml, se les midió su actividad elastolítica por el método de Chapman y cols. ya descrito anteriormente.

8. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

El estudio morfológico se realizó en forma ciega en todos los animales, tanto patológicos como normales.

Los pulmones fueron fijados en formaldehído al 10%, realizándose cortes transversales y longitudinales, de los lóbulos apicales y diafragmáticos, los cuales se incluyeron en bloques de parafina; posteriormente se obtuvieron cortes de 5 micras de grosor, que fueron montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina-eosina y la técnica tricrómica de Masson. Finalmente se observaron en el microscopio de luz, para localizar básicamente cambios y/o lesiones a nivel histológico, que dieran evidencias de daño por enfisema, usando como parámetros :

alteraciones inflamatorias

ruptura de septos alveolares

9. CUANTIFICACION DE LA DESTRUCCION ALVEOLAR.

Este ensayo se realizó de acuerdo a la técnica de Saetta Marina y cols. (37). La medición del índice destructivo (ID) fue realizada con un microscopio de luz usando el objetivo 10x, que contenía un ocular cuadrículado con 38 puntos equidistantes. Se contaron 10 campos por laminilla al azar. Si en el campo se observaba una vía aérea (como un bronquio o bronquiolo), o vaso sanguíneo o linfático de un diámetro mayor a 0.6 mm este no se contaba para el análisis. Las paredes alveolares se evaluaron como destruidas (D) o no destruidas (N). Los puntos que estaban sobre estructuras tales como paredes ductales o alveolares, no se contaron. Se consideró destruido un espacio alveolar cuando la pared del alveolo se encontraba rota en dos o más lugares y se observan clavos de retracción en sus extremos.

El ID fue calculado con la siguiente fórmula :

$$ID = D / (D+N) \times 100$$

donde:

ID = índice destructivo

D = paredes alveolares destruidas

N = paredes alveolares no destruidas

10. METODO ESTADISTICO.

Para todas las variables obtenidas tanto del grupo expuesto como de los no-expuestos al humo de cigarro, se expresaron como Media \pm Desviación estandar.

La significancia estadística de los diferentes valores entre los dos grupos fué calculada usando la prueba de "t" de Student. Toda probabilidad de que el resultado se deba al azar menor de 0.05 fué considerada significativa.

V. RESULTADOS.

Los animales expuestos al humo de cigarro, tuvieron un peso similar a los animales control de un mes (control 750g \pm 61g; expuestos al humo 700g \pm 43g con una $p > 0.05$). Ambos grupos de cobayos al final del periodo experimental tuvieron un peso similar al basal.

1. PRUEBA DE CARBOXIHEMOGLOBINA.

TABLA No. 2 a

DETERMINACION GASES SANGUINEOS EN COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARROS / DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

	COBAYOS EXPUESTOS					$\bar{X} \pm D. E.$
	1	2	3	4	5	
THb (g/l)	14.5	15.7	13.6	11.9	14.9	14.1 \pm 1.4
\bar{O}_2 -Hb (%)	62.7	17.9	32.9	28.4	38.5	36.0 \pm 5.8
CO-Hb (%)	25.1	17.9	26.9	29.1	21.0	24.0 \pm 4.5
MET-Hb (%)	1.7	0.8	1.1	1.3	1.5	1.2 \pm 0.3
CALC (% vol.)	12.6	2.8	6.2	4.7	8.0	6.8 \pm 3.7
R-HB (%)	10.5	68.6	39.2	41.2	38.9	33.6 \pm 6.0

TABLA No. 2 b CONTINUACION DE LA TABLA ANTERIOR.

		COBAYOS CONTROL		
		1	2	X ± DE
THb	(g/l)	9.6	13.2	11.4 ± 2.5
O-Hb	(%)	74.9	45.6	NR
CO-Hb	(%)	8.6	6.5	7.5 ± 1.4
MET-Hb	(%)	1.8	1.5	1.6 ± 0.4
CALC	(% vol.)	10.0	8.4	9.2 ± 1.1
RHb	(%)	14.6	46.4	NR

TBH= Hemoglobina total Met Hb = Meta hemoglobina
 O Hb = Oxígeno reducido Calc = Hemoglobina calculada NR = No representativ
 CO Hb = Carboxihemoglobina RHb = Hemoglobina reducida

2. LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES (LBA).

El líquido instilado de acuerdo a nuestros métodos fue el mismo en ambos grupos de cobayos. El líquido recuperado fue similar para ambos grupos de animales. La cantidad total de células recuperadas fué significativamente mayor en el grupo de cobayos expuestos al humo de cigarro (tabla No. 3); como se esperaba la población celular prevalente en el líquido del lavado bronquioalveolar fué la de los macrófagos (65%). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de los diferentes tipos celulares entre el grupo

de cobayos expuestos versus los no expuestos al humo de cigarrillos.

La tabla presenta los resultados obtenidos de los frotis realizados de lavados bronquioalveolares, de cobayos experimentales y controles.

TABLA No. 3
RELACION DE VOLUMENES INSTILADOS Y RECUPERADOS EN LBA
DE COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARROS
/ DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

	VOLUMEN INSTILADO (ml)	VOLUMEN RECUPERADO (ml)
COBAYOS EXPUESTOS	70	52.14 ± 7.64
CONTROLES	70	50.20 ± 8.52

CONTEO DIFERENCIAL DE CELULAS INFLAMATORIAS OBTENIDAS
MEDIANTE FROTIS DEL LAVADO BRONQUIOALVEOLAR EN
COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARROS
/ DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

	CELULAS TOTALES	MACROFAGOS %	NEUTROFILOS %	LINFOCITOS %
COBAYOS EXPUESTOS	8.6 X 10 ⁶ ± 2.10	65.85 ± 15	11 ± 7.44	22.2 ± 8.44
CONTROLES	6.4 X 10 ⁶ ± 1.78	63.20 ± 5.5	7 ± 3.08	27.8 ± 5.90

3. PRUEBA DE VIABILIDAD EN CELULAS UTILIZANDO AZUL DE TRIPANO.

En todas las muestras tomadas de los lavados bronquioalveolares y de tejido, tanto de los cobayos expuestos al humo de cigarro como de los no expuestos, el promedio de viabilidad de las células fué de un 85%.

4. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

En todas las muestras de los animales expuestos al humo de cigarro, se observaron cambios inflamatorios y estructurales, medidos de acuerdo a los parámetros desglosados en el material y método.

La inflamación observada, consistió en un infiltrado intersticial de predominio mononuclear (compuesto por linfocitos y macrófagos), como puede observarse en la Figura No. 1, y en algunos casos, presencia de células gigantes. Sin embargo, en ciertos animales, llegaron a observarse polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos); estas alteraciones inflamatorias se presentaron focalmente y en ocasiones su distribución fué peribronquiolar. En muchos de

los casos se observó descamación de macrófagos y células gigantes en la luz de los alveólos.

La ruptura de los septos alveolares, se pudo apreciar en zonas subpleurales y distales a los bronquiolos, en dichas zonas, había paredes muy adelgazadas y de aspecto rígido, varias estaban rotas y presentaban "clavas de retracción" Figura No. 2, muy pocos pulmones mostraron edema leve, en estas zonas de ruptura. En ningún caso se observó que estas mismas zonas coincidieran con aquéllas en donde había inflamación.

Las muestras de pulmón de los animales control, no presentaron ninguno de estos signos usados como parámetros, para determinar si había o no daño por enfisema Figuras No. 4 y 5.

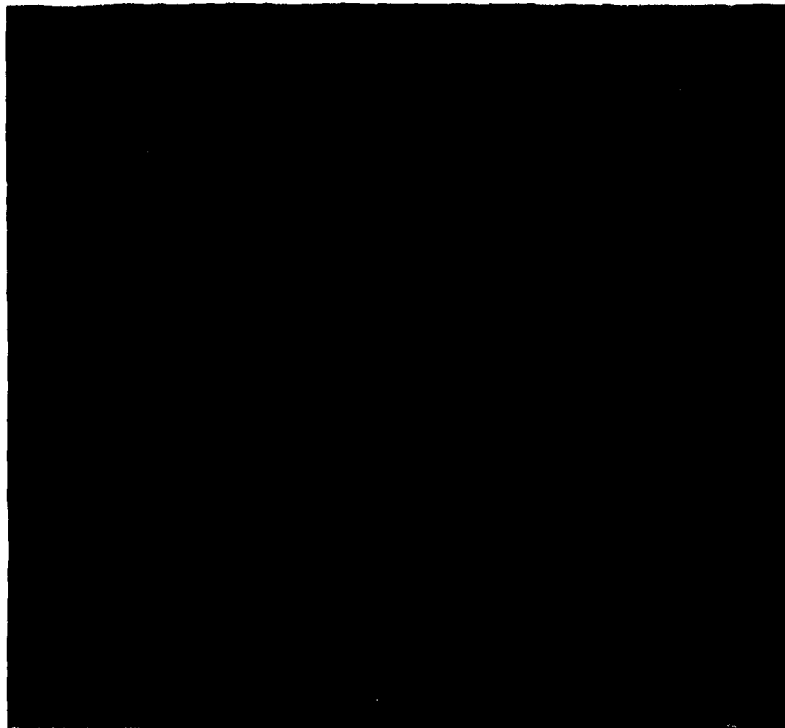


FIGURA No. 1 Micrografía de pulmón de cobayo del grupo experimental expuesto a humo de cigarro durante 6 semanas, en donde se observa un infiltrado intersticial y peribronquiolar, además de numerosos macrófagos descamados hacia la luz alveolar.

Tinción Hematoxilina y Eosina (170 X)



FIGURA No. 2 Micrografía de pulmón de cobayo del grupo experimental expuesto a humo de cigarro durante 6 semanas, en el que se aprecia pérdida de la continuidad de las paredes alveolares por ruptura de las mismas, también pueden observarse clavos de retracción.

Tinción Hematoxilina y Eosina (170 X)



FIGURA No. 3 Micrografia de pulmón de cobayo del grupo experimental expuesto a humo de cigarro durante 6 semanas, en el que se aprecia ruptura de paredes o septos alveolares, semejante a la que se observa en el daño por enfisema. Tinción Hematoxilina y Eosina (54 X)

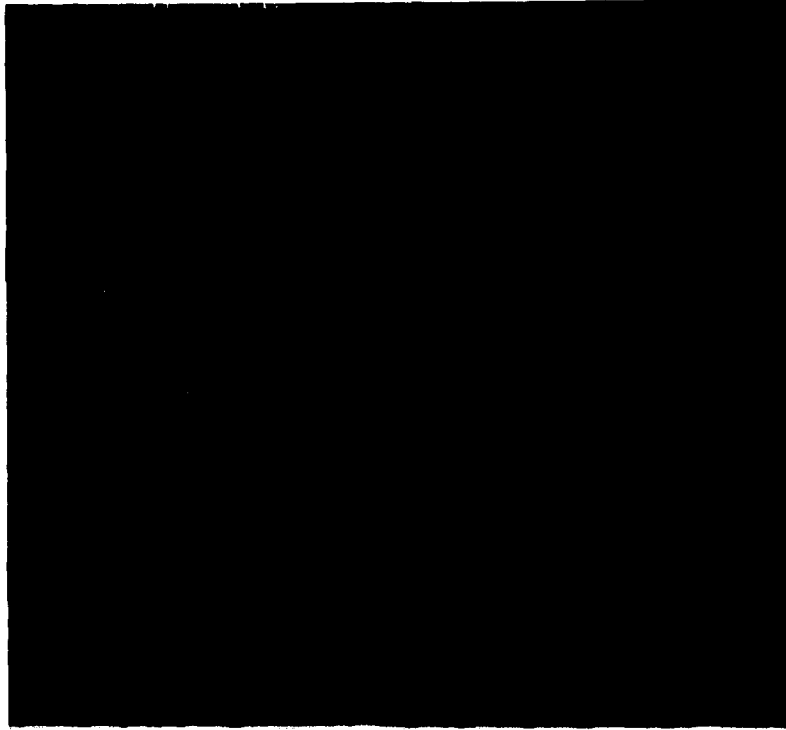


FIGURA No. 4 Micrografía de un corte histológico de pulmón de cobayo del grupo control, en donde se aprecian los espacios alveolares y los bronquiolos con sus paredes íntegras.

Tinción Hematoxilina y Eosina (54 X)

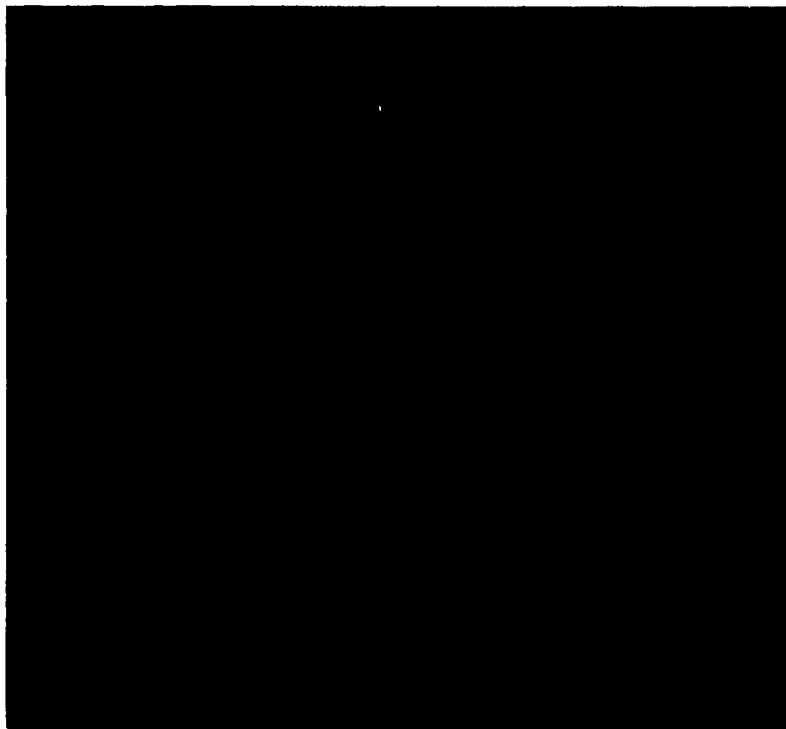


FIGURA No. 5 Micrografía de pulmón de cobayo normal, perteneciente al grupo control, en donde se observan intactas las paredes alveolares y bronquiolares.

Tinción Hematoxilina y Eosina (170 X)

5. CUANTIFICACION DEL INDICE DESTRUCTIVO.

La destrucción de las paredes alveolares es considerada por la mayoría de los investigadores como la parte más importante en la definición de enfisema. En este trabajo se utilizó el método de Marina Saetta y cols (36). Esta es una técnica microscópica cuya confiabilidad para cuantificar la destrucción alveolar ha sido probada.

Como se puede apreciar en la tabla No. 4 de resultados, en los cobayos expuestos al humo de cigarros se observó un índice destructivo de 22, en tanto que en los cobayos controles, este fue de 12 ($p < 0.05$).

TABLA No. 4

INDICE DESTRUCTIVO DEL PARENQUIMA PULMONAR EN COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARRO / DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

	COBAYOS CONTROL	COBAYOS EXPUESTOS	
	14.40	17.45	
	16.20	21.14	
	13.75	14.68	
	7.00	11.48	
	16.71	23.64	
	10.18	30.06	
	7.00	33.93	
X ± D. E.	21.76 ± 8.11	12.17 ± 4.11	p ≤ 0.016

6. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES E INTERSTICIALES.

En la tabla No.5 se muestran los resultados de la actividad elastolítica tanto de los macrófagos alveolares como de los intersticiales de los 7 cobayos controles. Al comparar la actividad elastolítica (AE) de los macrófagos alveolares contra la de los macrófagos intersticiales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre unas y otras, en ninguno de los intervalos de tiempo en los que se estudió esta actividad.

En la tabla No.6 se muestran los resultados de la comparación de la AE de los macrófagos alveolares vs la AE de los macrófagos intersticiales, de los cobayos expuestos al humo de cigarro. Como puede observarse la diferencia obtenida tampoco fue estadísticamente significativa.

La degradación de la elastina tanto de los macrófagos alveolares como de los macrófagos intersticiales, fué mínima durante las primeras 24 hrs, y un sorprendente incremento ocurre en el intervalo de 48hrs a 72hrs. Por otro lado al confrontar la AE de los macrófagos tanto de los cobayos expuestos a humo de cigarro, como de los cobayos control. Se observó que, la AE de los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro es más alta en todos los

intervalos de tiempo en comparación a la AE de los macrófagos alveolares de los cobayos control tabla No. 7. La AE de los macrófagos intersticiales de cobayos expuestos a humo de cigarro también se encuentra incrementada en comparación con la AE de los macrófagos intersticiales de los cobayos control tabla No. 8.

En el intervalo de 72hrs, la AE de los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro en comparación con la AE de los macrófagos alveolares de cobayos control es más alta. Sin embargo la AE de los macrófagos intersticiales de cobayos expuestos a humo de cigarro en comparación con la AE de los macrófagos intersticiales de cobayos control no presentó un incremento significativo.

Como puede apreciarse la AE de los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro, con respecto a la AE de macrófagos alveolares de cobayos control se incrementa siempre significativamente, en los tres intervalos de tiempo. Por lo tanto la AE está incrementada en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro en comparación a los no expuestos.

En cuanto a la AE de los macrófagos intersticiales de cobayos expuestos a humo de cigarro, también se encuentra incrementada en comparación a la AE de los macrófagos intersticiales de los cobayos control, a excepción del intervalo de 72 hrs.

TABLA No. 5

ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES E INTERSTICIALES DE COBAYOS CONTROL.

Tiempo (horas)	ug DE ELASTINA DEG. / 1 X 10⁶ MACROFAGOS		p ≤
	alveolares	intersticiales	
24	4.72 ± 2.10	2.97 ± 2.37	N.S.
48	7.67 ± 3.71	5.13 ± 3.49	N.S.
72	9.99 ± 5.26	7.36 ± 4.99	N.S.

TABLA No. 6

**ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES E
INTRESTICIALES EN COBAYOS EXPUESTOS AL HUMO DE 20
CIGARROS / DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.**

tiempo (horas)	ug de elastina degradados / 1 X 10⁶ macrófagos alveolares	intersticiales	p≤
24	8.24 ± 2.65	6.41 ± 1.95	N.S.
48	15.61 ± 6.07	10.12 ± 4.54	N.S.
72	19.01 ± 9.42	11.82 ± 7.68	N.S.

TABLA No. 7

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARROS POR DIA / 5DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

TIEMPO (horas)	ug DE ELASTINA DEGRADADOS / 1×10^6 MACROFAGOS ALVEOLARES		p \leq
	CONTROLES	EXPUESTOS	
24	4.72 \pm 2.10	8.94 \pm 2.65	0.006
48	7.67 \pm 3.71	15.21 \pm 6.07	0.01
72	9.99 \pm 5.26	19.01 \pm 9.42	0.04

TABLA No. 8

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE MACROFAGOS INTERSTICIALES DE PULMONES DE COBAYOS CONTROL Y EXPUESTOS AL HUMO DE 20 CIGARROS / DIA / 5 DIAS SEMANALES / 6 SEMANAS.

TIEMPO (horas)	ug DE ELASTINA DEGRADADOS / 1×10^6 MACROFAGOS INTERSTICIALES.		p \leq
	CONTROLES	EXPUESTOS	
24	2.97 + 2.37	6.41 + 1.95	0.01
48	5.13 + 3.49	10.12 + 4.54	0.04
72	7.36 + 4.99	11.82 + 7.68	0.23

7. NUMERO TOTAL DE MACROFAGOS ALVEOLARES CON Y SIN FICOLL.

En el LBA del cobayo número 1, expuesto a humo de cigarro se obtuvo un total de 18,850 000 células, de esta suspensión se tomaron 9 ml y se le dio tratamiento con ficoll, la cuenta total de células fue de 8,550 000 células. En el LBA del cobayo número 2, expuesto a humo de cigarro, se obtuvo un total de 8,850 000 células, de esta suspensión se tomaron 4 ml y se le dio tratamiento con ficoll, la cuenta total de células fue de 4,830 000. En el LBA del cobayo número 3, expuesto a humo de cigarro, se obtuvo una cuenta total de 5,100 000 células, de esta suspensión se tomo la mitad 2.5 ml y se le dio tratamiento con ficoll, la cuenta total de células fue de 1,080 000.

8. LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES TRATADOS CON Y SIN TRIPSINA DE COBAYOS EXPUESTOS A HUMO DE CIGARRO.**TABLA No. 9**

LAVADO CON TRIPSINA	LAVADO SIN TRIPSINA	p
AE	AE	
X ± DE	X ± DE	
10.87 ± 1.98	14.41 ± 2.16	N.S.

AE = ACTIVIDAD ELASTOLITICA**No hubo diferencia significativa entre la actividad elastolítica del lavado tratado con tripsina y el lavado que no fué tratado con tripsina.**

VI. DISCUSION.

La teoría que actualmente prevalece para explicar los cambios destructivos que se observan en el enfisema pulmonar es la del desequilibrio entre las proteasas y las antiproteasas. La elastasa derivada de los neutrófilos es la proteasa que se ha considerado de mayor importancia en este proceso destructivo. Sin embargo, recientes evidencias sugieren que los macrófagos alveolares pueden ser de importancia crucial durante el proceso de destrucción de las fibras de elastina, debido a que estas células secretan proteasas y citocinas que afectan a su vez la producción de proteasas por otras células, además participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular. Son sin embargo, pocos los estudios en los que se ha demostrado el papel elastolítico de estas células. En la mayoría de estos estudios han utilizado macrófagos obtenidos de la luz alveolar, es decir, aquellos que derivan de los capilares del intersticio y que por lo tanto no son los que están en contacto directo con las fibras de elastina del intersticio del pulmón. La pregunta que surge a la luz de los resultados publicados con respecto a la actividad elastolítica de los macrófagos alveolares (MA) es que si ésta es comparable con la de los macrófagos intersticiales (MI). Este trabajo fue diseñado para responder esta pregunta, con la finalidad de

ampliar el conocimiento sobre el papel que desempeñan los macrófagos tanto alveolares como intersticiales en el desarrollo del enfisema pulmonar. El humo de cigarro esta asociado marcadamente con el incremento en el número de macrófagos alveolares recolectados de lavados bronquioalveolares, y el examen histológico de los pulmones de los fumadores demuestra infiltración de los macrófagos dentro y alrededor de los pequeños conductos aéreos que sufrieron cambios destructivos, durante el desarrollo del enfisema pulmonar. Estas observaciones y la estrecha asociación entre el fumar y el enfisema sugieren que los macrófagos juegan un papel muy importante en la patogénesis del enfisema pulmonar, ya que la degradación de las fibras elásticas del parenquima pulmonar aparece como un factor central en el desarrollo de esta enfermedad.

Por lo tanto, en este trabajo se seleccionaron cobayos expuestos a humo de cigarro y cobayos no expuestos a humo de cigarro tomados como controles. Como puede apreciarse en los resultados, al comparar la actividad elastolítica de los MA con respecto a la actividad elastolítica de MI, en los cobayos expuestos a humo de cigarro, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre las dos actividades elastolíticas. De la misma forma al comparar la actividad elastolítica de los MA y de los MI de los cobayos expuestos a humo de cigarro, no se obtuvo diferencia estadísticamente

significativa. Sin embargo, la actividad de los MA de los cobayos expuestos a humo de cigarro, es considerablemente más alta, que la actividad elastolítica de los MA de los cobayos no expuestos a humo de cigarro. Sugiriendo esto, que tanto los MA como los MI pueden degradar elastina en un medio que contiene suero, y que esta actividad se incrementa cuando son estimulados con el humo de cigarro. Por lo tanto los fenómenos elastolíticos que ocurren en el parénquima pulmonar podrían ser inferidos a través del estudio de los macrófagos alveolares.

Vale la pena hacer algunas consideraciones alrededor de estos resultados: Primero, ¿ Son macrófagos las células a las que les estamos dando esta connotación? Se considera que más del 90% de la población celular de la luz alveolar son macrófagos. Aunque su apariencia es fácil de distinguir, podrían confundirse con fibroblastos o células epiteliales enrolladas. Para este estudio se consideraron en la cuenta total de células sólo aquellas que tenían el mayor tamaño y presentaban un núcleo redondo cuyas características fueran compatibles con la de los macrófagos. Además, después de hacer el conteo diferencial de células de cada uno de los lavados bronquioalveolares se encontró que menos del 5% del total de las células correspondía a células epiteliales y/o fibroblastos. Es decir, si se hubieran incluido células epiteliales o fibroblastos en las células que se expusieron

a la elastina éstas hubieran sido menos del 5% del total de las células que se consideraron. Por otro lado el error hubiera sido sistemático, tanto para los cobayos controles y los expuestos a humo de cigarro, como para las poblaciones de macrófagos considerados como intersticiales o alveolares.

Segundo, ¿ Son intersticiales los macrófagos a los que les estamos dando esta connotación? Así como existen marcadores para los diferentes tipos celulares, también los hay para los diferentes tipos de macrófagos. En este trabajo no se utilizó ningún marcador específico para la identificación de las células. Esto abre la posibilidad de que las células que se consideraron como MA estén contaminadas con MI. Para evitar esta posibilidad se hizo el lavado pulmonar con 70ml de solución salina, que barrió con todas las células de la luz alveolar. Además el número total de macrófagos obtenidos de tejido pulmonar, fué siempre menor al número total de macrófagos obtenidos de la luz alveolar. Esto sugiere que si hubiera existido un número significativo de células alveolares remanentes, el número de células obtenidas del tejido hubiera sido igual o mayor al obtenido de la luz alveolar. Otro punto importante que cabe aclarar sobre los resultados obtenidos en este trabajo, resulta de la posibilidad de que parte de la actividad elastolítica observada pudiera derivar de la elastasa de neutrófilos. Sin embargo, para evitar esta posible contaminación las células

que se pusieron a incubar para medir la actividad elastolítica, fueron exclusivamente las adherentes que se obtuvieron después de incubar por dos horas todas las células que fueron consideradas como macrófagos y eliminar las no adheridas (las principales células adherentes son los macrófagos y los linfocitos). Adicionalmente, debido a que la elastasa derivada de los neutrófilos es lábil a la acción de la alfa-1-antitripsina, todas las muestras se incubaron con suero fetal bovino al 10%. La posibilidad de contaminación por elastasa de neutrófilos en la incubación de MI es menos probable, porque todas las muestras obtenidas de tejido, fueron pasadas por un gradiente de ficoll-hypaque, que permite sedimentar a los polimorfonucleares y deja en la interfase solamente mononucleares, es decir, solamente linfocitos y macrófagos. Este procedimiento eliminó en los MI la posible contaminación por neutrófilos. Además el uso del gradiente de ficoll-hypaque da mayor seguridad a la ausencia de polimorfonucleares en la muestra que se estudia.

El objetivo de incluir en este trabajo, cobayos expuestos a humo de cigarro (CEHC) , fué el de hacer un claro contraste de la actividad elastolítica de los cobayos expuestos con respecto a los no expuestos a humo de cigarro. Por lo tanto el diseño debía de ser útil para señalar la similitud o la diferencia en cuanto a la AE de los MA y los MI, en cobayos

con cambios patológicos compatibles con enfisema, como en aquellos considerados como normales o controles. En este sentido la AE de los MA fué igual a la de los MI tanto en los cobayos expuestos al humo de cigarro como en los cobayos no expuestos (CNEH). Por lo tanto los fenómenos elastolíticos que ocurren en el parénquima pulmonar podrían ser inferidos a través del estudio de los macrófagos alveolares. Aunque la incubación enzimática a la que se sometió el tejido que se utilizó para obtener los MI, disminuye la AE, esta disminución no es estadísticamente significativa, como demostramos en un experimento colateral a este trabajo.

El hecho de que los CEHC tuvieran niveles significativamente más altos de carboxiemoglobina (COHb) que los CNEHC demuestra que estos animales realmente estaban inhalando las partículas derivadas del humo de cigarro incluyendo el monóxido de carbono. Los niveles tan altos de COHb, que se observaron en todos los animales, incluyendo los normales, podrían deberse a que el aparato que se utilizó está diseñado para medir COHb en sangre humana y no en cobayos.

El incremento de la celularidad en los lavados bronquioalveolares de los CEHC es un indicador adicional de que los animales estaban inhalando el humo de cigarro. Uno de los primeros cambios observados en los pulmones de los

sujetos fumadores es un incremento de la celularidad total en el lavado bronquialveolar, como de hecho se observó en los animales expuestos al humo de cigarro. Los cambios compatibles con enfisema encontrados en los CEHC ya han sido previamente documentados. Y aunque el objetivo de este trabajo no era demostrar cambios patológicos compatibles con enfisema en los pulmones de los CEHC, sí era importante demostrar que la AE de los macrófagos tanto alveolares como intersticiales se aumenta cuando estos son estimulados, y que de alguna manera esto afecta la degradación de proteínas de la matriz extracelular como la elastina, este es un dato importante porque muestra que es posible que tanto los MA como los MI, participen de una manera conjunta con las demás células inflamatorias, en el daño directo al tejido pulmonar, ocasionando enfisema. A pesar de que los MI no se encuentren en contacto directo con las partículas del humo de cigarro.

Otro punto importante es que la degradación de la elastina por parte de los macrófagos, se incremento marcadamente despues de 24 hrs de contacto con la elastina. Es posible que el incremento de la actividad elastolítica despues de 24 hrs resulte de la nueva síntesis de metaloproteasas, o simplemente refleje la estabilización de las células despues de ser colectadas.

Aunque este proceso aún no es claro, es evidente que los neutrófilos no son las únicas células que participan en el desencadenamiento de la patógenesis del enfisema. Sino que esta desorganización en el tejido pulmonar se debe a una serie de eventos que están relacionados entre sí, en donde las células inflamatorias juegan un papel muy importante.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VII. BIBLIOGRAFIA.

1.- Snider GL, Lucey EC, Stone P.J. Animal models of emphysema. Am Rev Respir Dis 1986; 133:149-169.

2.- Eriksson S. Emphysema before and after 1963. Historic perspectives. Ann N Y Acad Sci 1991;624 : 1-6.

3.- Gordon L. Snider. Emphysema: The first two centuries and beyon. A historical overview, with suggestions for future research: Part 1. AM REV RESPIR DIS; 1992;146:1334-1344.

4.- Senior M. Robert; Kunh III Charles. The Pathogenesis of emphysema. Chapter 74. In: Pulmonary Diseases and Disorders. Fishman P. Alfred. Segunda edición, Vol.2, pag:1209-1218.

5.- Janoff A. Elastases and emphysema. Current assesment of the protease-antiprotease hypothesis. Amer Rev Respir Dis 1985; 132: 417-433.

6.- Starcher BC. Elastin and the Lung. Thorax 1986; 41: 577

7.- Church DF, Pryor WA. The oxidative stress placed on the lung by cigarette smoke. In : Crystal RG, West JB, et al. eds. The Lung, Vol. II. New York, Raven Press, Ltd, 1991: 1975-1979.

8.- Higgins M. Risk factors associated with chronic obstructive lung disease. Ann N Y Acad Sci 1991; 624:7-17

9.- Jennings A. Constance; Crystal G. Ronald. Inflammatory Lung Disease, Molecular Determinants of Emphysema, Bronchitis, and Fibrosis. Chapter 50, In: Inflammations Basic Principles and Clinical Correlates. Second edition. Edited by J. I. Gallin, I. M. Goldstein and R. Snyderman. New York, 1992; pag:983-994.

10.- Hubbard RC, Crystal RG. Vulnerability of the lung to proteolytic injury. In. Crystal RG, West JB, et al. eds. The Lung, Vol. II. New York, Raven Press, Ltd,1991; 2059-2071.

11.- Janoff Aaron; Pryor A. William; Bengali H. Zakir. Effects of tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. Workshop Summary, Maryland May 1986;1058-1064.

12.- Snider GL, Ciccolella DE, Morris SM, et al. Putative role of neutrophil elastase in the pathogenesis of emphysema. Ann N Y Acad Sci 1991; 624:45-59.

13.- Janoff A. Elastases and emphysema. Current assesment of the protease-antiprotease hypothesis. Amer Rev Respir Dis 1985;132: 417-433.

14.- Soskel N., Sandberg L. Pulmonary Emphysema from animal models to human diseases. Molecular Pathology of the Extracellular Matrix. ed. Vitto J., Perejda A. The Biochemistry of Disease, A Series of Monographs. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 12, 1989; 19: 423-444.

15.- Parks WC. Deak SB. Tropoelastin heterogeneity: Implications for protein funtion and disease. Am J Resp Cell Moll Biol; 1990;2:399-406.

16.- Hubbard RC, Crystal RG. Vulnerability of the Lung to proteolytic injury. In: Crystal RG. West JB, et al. eds. The Lung, Vol II. New York, Raven Press, Ltd, 1991: 2059-2071.

17.- Chapman HG., Stone OL. Comparison of human neutrophil and alveolar macrophages elastolytic activity in vitro. Relative resistance of macrophage elastolytic activity to serum and alveolar proteinase inhibitors. J Clin Invest, 1984; 74:1693-1700.

18.- Senior M. Robert; Connolly L. Noren; Cury D. James; y Campbell J. Edward. Elastin degradation by human alveolar macrophages. Am Rev Respir Dis 1989; 139:1251-1256.

19.- Sibille Y., Reynolds Y. Herbert. Macrophages and Polimorphonuclear neutrophils in Lung defenza and injury. AM REV RESPIR DIS; 1990; 141:471-501.

20.- Wright Joanne, Churg Andrew. Cigarette Smoke Causes Physiologic and Morphologic Changes of emphysema in the Guinea Pig. Am Rev Respir Dis 1990; 142:1422-1428.

21.- Mehan RP. Elastyn synthesis and fiber assembly. Ann N Y Acad Sci 1991;624:137-146.

22.- Mehan RP, Prosser IW, Fukuda Y. Elastic fibers. Crystal RG, West JB, et al, eds. The Lung. New York: Raven Press 1991:389-398.

23.- Keith DA, Paz MA, Gallop PM, Glimcher MJ. Histologic and biochemical identification and characterization of and elastin in cartilage. J Histochem Cytochem 1977; 25: 1154-1162.

24.- Lasing Al, Rosenthal TB, Alex M, Dempsey EW. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and electron microscopy. Anat Rec; 1952;114:55-57.

25.- Campagnone R, Regan J, Rich CB, et al. Pulmonary fibroblast: A model system for studying elastin synthesis. Lab Invest 1987; 56: 224-230.

26.- Robert JL, Varga MB, Robert L. Extracellular matrix. FEBS Lett 1990;268:386-393.

27.- Rucker Rb, Dubick MA. Elastin metabolism and chemistry: Potencial roles in lung development and structure. Environ health perspect. 1984;268:386-393.

28.- Senior RM, Connelly, Cury JD, Welgus HG, Campbel EJ. Elastin degradation by human alveolar macrophages: a prominente role of metalloproteinase activity. Am Rev Respir Dis 1989; 139:1251-1256.

29.- Eyre DR. Cross-linking in collagen and elastin. Ann Rev Biochem 1984;53:717-748.

30.- Davidson JM, Giro MG. Control of elastin synthesis: molecular and cellular aspects. In: Mecham RP, Spooner BS, eds. Biology of the extracellular matrix. New York: Academic Press, 1985: 178-216.

31.- Banga I. Thirty-five years in elastase research. Connect Tissue Res. 1986; 15: 3-7.

32.- Travis J, Dubin A, Potempa J, et al. Neutrophil proteinases. Caution signs in designing inhibitors against enzymes with possible multiple functions. Ann N Y Acad Sci 1991; 624: 81-86.

33.- Chapman HD. Roles of enzyme receptors and inhibitors in regulating proteolytic activities of macrophages. Ann N Y Acad Sci 1991; 624: 87-96.

34.- Morrison HM, Welgus HG, Stockel RA, et al. Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin: relative ineffectiveness and two mechanisms of inhibitors activity. Am J Respir Cell Mol Biol. 1990; 2: 263-269.

35.- Ginski J, Weglarz L, Drozd M, et al. Modulation of elastase-like activity in fibroblast stimulated with elastin peptides. Biochem Med Metab Biol 1991; 45:254-257.

36.- Saetta M., Shiner R., Kim W., Wang N. Destructive Index: A Measurement of lung parenchymal destruction in smokers. AM REV RESPIR DIS 1995; 131:764-769.