

21,30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO "in vitro" PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA COMBUSTION DEL TABACO SOBRE LAS PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LA ALBUMINA.



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ROSA MA. CHAVEZ JUAREZ



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 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.

ABREVIATURAS

Ac	-Anticuerpo
A.C.F.	-Adyuvante completo de Freund
A.I.F.	-Adyuvante incompleto de Freund
Ag	-Antígeno
ASB	-Albumina serica bovina
CH	-Condensado de humo
CIEF	-Contrainmunolectroforésis
E-ASB	-Eritrocitos sensibilizados con albúmina sérica bovina
E- Sólidos	-Eritrocitos solamente fijados con glutaraldheído
IDR	-Inmunodifusión radial
IEF	-Inmunolectroforésis
Ig	-Inmunoglobulinas
Kd	-Kilo Daltons
LB	-Linfocito B
LT	-Linfocito T
PM	-Peso Molecular
rpm	-Revoluciones por minuto
SSP-Az	-Solución salina fosfato con azida de sodio

INDICE

Resumen -----	1
Introducción -----	3
Planteamiento del problema -----	14
Hipotesis -----	14
Diseño Experimental -----	15
Material y Métodos -----	19
Resultados -----	30
a) Tablas -----	36
b) Figuras -----	41
Discusión -----	42
Conclusiones -----	50
Bibliografía -----	52

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es, demostrar que el humo del tabaco generado durante la combustión del cigarrillo, arrastra las proteínas que están en las zonas de menor temperatura del cigarrillo; aproximadamente 60°C en la parte media y 37°C en la región opuesta a la combustión, y que al llevarse a cabo el fenómeno, estas moléculas conservan sus propiedades inmunoquímicas. Para demostrar lo anterior se diseñó un modelo en el cual se utilizaron dos series de 10 cigarrillos cada una, una experimental y otra testigo; a cada cigarrillo experimental se le inyectó un volumen constante de diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (ASB), mientras que a los cigarrillos testigo se les inyectó un volumen similar de SSF sin proteína. Ambas series se dejaron secar durante 48 hr a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se procedió a la combustión de cada uno de los cigarrillos por separado y el humo producido fue condensado a 4°C en 10 ml de solución salina (CH). Se observó que los CH provenientes de cigarrillos a los cuales se les había inyectado una mayor concentración de ASB presentaban un aumento de la concentración de proteína total comparado con los CH provenientes de los cigarrillos testigos. Para identificar y cuantificar la ASB en los CH se emplearon técnicas inmunoserológicas usando sueros anti-ASB obtenidos por la inmunización de conejos. Los CH experimentales y testigos se enfrentaron contra el suero anti-albúmina por las técnicas de contraelectroforesis e inmunoelectroforesis obteniéndose en algunos de los CH experimentales bandas de inmunoprecipitación, comprobándose que los CH problema contenían ASB

la cual conserva sus propiedades inmunológicas ya que fue reconocida por los anticuerpos anti-ASB. Ninguno de los CH testigos presentó banda de inmunoprecipitación al enfrentarlo al anticuerpo anti-albúmina. Habiendo identificado la presencia de ASB en los CH experimentales, se procedió a llevar a cabo su cuantificación por las técnicas de inhibición de la hemaglutinación pasiva e inmunodifusión radial encontrándose de 6.8 a 114 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo de la cantidad de ASB aplicada a cada cigarrillo.

En base a los resultados obtenidos se concluye que el humo generado por la combustión del tabaco y aspirado por el fumador es capaz de acarrear proteínas las cuales sufren una descomposición mínima por la temperatura y otros factores fisicoquímicos.

INTRODUCCION

El tabaquismo es un hábito que constituye un grave problema de salud que afecta a millones de personas en todo el mundo y que actualmente ocupa un primer plano entre los problemas médicos pues está relacionado con enfermedades graves y crónicas, encontrándose entre las más frecuentes aquellas que afectan al aparato respiratorio (1,6,38).

El tabaco (*Nicotina tabacum*) es una planta originaria de América y pertenece al orden de las Solanaceas, género *Nicotina*, del cual existen alrededor de 60 especies, crece en climas cálidos y templados. A la llegada de los españoles el tabaco se fumaba con fines ceremoniales o medicinales, principalmente en las antillas, México, Brasil, Florida y Virginia. Posteriormente fue introducido a Europa donde en principio se consideró que el fumarlo era desagradable y sucio, además de dañino a los pulmones y al cerebro, pero a pesar de esto su consumo se generalizó a todo el mundo atribuyéndole propiedades medicinales para tratar diversos males tales como dolor de muelas, reumatismo e indigestión entre otros (38).

En el siglo XX, el tabaquismo se extendió entre hombres y mujeres consumiéndose cigarrillos. Su generalización se ha asociado al incremento de varios padecimientos como el cáncer de diversos órganos, especialmente el pulmonar, así como enfisema, bronquitis crónica, cardiopatía isquémica y otros accidentes cardiovasculares (3)

El consumo de tabaco en nuestro país se ha incrementado en los últimos años determinándose además que la edad a la que se inicia

el hábito tabaquico está entre los 12 y 13 años, también el consumo de tabaco por parte del sector femenino se ha incrementado notablemente (38). Los mexicanos compran alrededor de 1,200 millones de cajetillas al año desprendiéndose de esto que en el presente año se tendrá un incremento del 60% en la producción del tabaco en relación a 1985.

Las hojas del tabaco contienen centenares de componentes pero dos grupos de ellos son característicos de esta planta; uno es la nicotina y los alcaloides derivados de ella, el otro es el grupo de los isoprenoides. Las sustancias más nocivas para la salud del fumador son el alquitrán, el monóxido de carbono y la nicotina. Del alquitrán se han aislado Polonio, Níquel y Cadmio que se ha relacionado con la patogénesis del daño pulmonar y cáncer bronco génico, así como el benzopireno que es un potente carcinógeno. Cua dro 1.

La mayoría de los componentes carcinogénicos identificados en el alquitrán del humo del cigarrillo no están presentes en la hoja natural del tabaco sino que pueden formarse durante el proceso químico que se da a ésta para formar el cigarrillo o bien durante la combustión de este. En el cigarrillo pueden describirse tres zonas principales de la combustión: la zona carbonosa, que es la transformación al carbón (600°) 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 (900°), el carbón se oxida en esta región transformándose a dióxido y monóxido de carbono; la zona de ceniza que corresponde a

Cuadro 1.-CONSTITUYENTES DEL HUMO DEL TABACO

AGUA	FENOL
ALCALOIDES, NICOTINA	ORTOCRESOL
ALQUITRANES	META Y PARACRESOL
ISOPRENO	CATECOL
ACETALDHEIDO	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 ORGANOSULFURADOS	POLONIO
ACETONA	COBRE
NEOFITADIENO	ZINC
PLOMO	MERCURIO
	ESTAÑO

la oxidación completa de los compuestos orgánicos y aquí sólo queda un residuo de polvo formado por sales minerales de color claro.

Las partículas del humo inhaladas se retienen en un 80 a 90% por el aparato respiratorio del hombre si la respiración se sostiene de dos a cinco segundos, estas partículas penetran en las vías respiratorias y pueden depositarse en la superficie de los bronquios respiratorios y hasta los alveolos en donde penetran al tejido o bien son eliminadas (40)

La cantidad de alquitrán que produce el humo de un cigarrillo varía entre 3 y 40 mg dependiendo del tamaño ó la longitud del mismo, del uso de filtro, de la porosidad del papel con que está hecho, del contenido de tabaco, del peso y de su procesamiento (6). Además existe una destilación seca que se caracteriza por el desprendimiento de gases de los hidrocarburos, aldehídos, nicotina, vapor de agua y otros productos volátiles (6, 40). El alquitrán contiene numerosos carcinógenos siendo los más relevantes los hidrocarburos policíclicos.

Los daños producidos por el tabaco sobre el individuo fumador no se manifiestan inmediatamente sino que hay un período de latencia que puede ser de varios años entre el momento del inicio del hábito tabáquico y la aparición de los primeros síntomas de las enfermedades relacionadas con él, cómo ocurre con el cáncer pulmonar, bronquitis crónica, gastritis y úlcera gástrica. El tabaquismo en las mujeres embarazadas puede alterar el desarrollo normal del producto provocando que los productos pesen de 300 a 400 g menos que los de mujeres no fumadoras. En el sistema circulatorio del

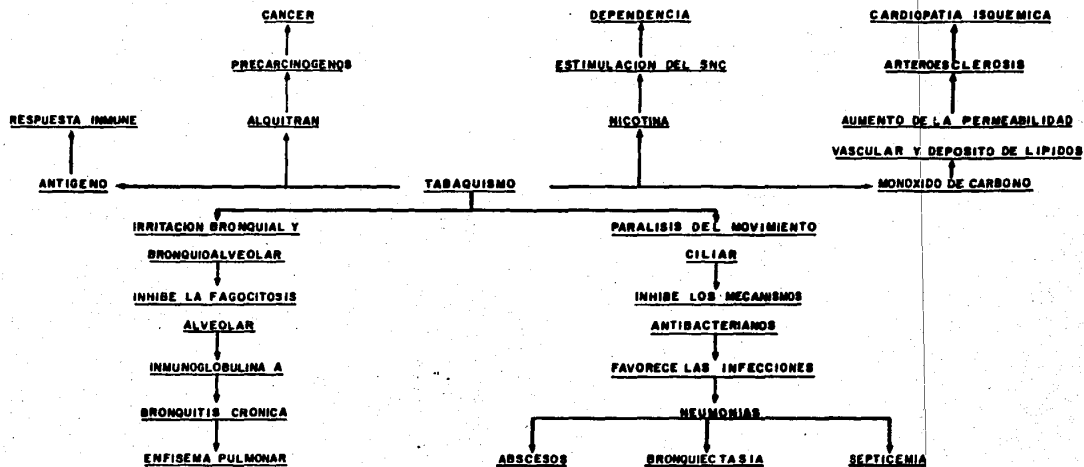
producto hay vasoconstricción y trastornos de la motilidad gastro intestinal, así como un aumento de la frecuencia respiratoria, por todo lo anterior se dificulta el manejo de un recién nacido de madre fumadora (6,18)

Las enfermedades más graves y frecuentes de los fumadores están relacionadas directamente con el número de cigarrillos consumidos diariamente, así como la influencia de otros factores como la edad a la que se inicia el hábito, duración del mismo, tipo de tabaco y de cigarrillos consumidos, grado de inhalación del humo, fumar el cigarrillo hasta el final, etc. (6) (figura 1)

Debemos considerar que el cigarrillo no sólo afecta a los fumadores, sino también a los no fumadores que inhalan los productos de la combustión del tabaco en atmósferas saturadas de humo exponiéndose estos individuos a consecuencias similares a las que se observan en fumadores. En Alemania Maramatsu ha demostrado que una persona que se encuentra en un sitio público donde se esté fumando (restaurantes, cafeterías, oficinas, etc.) inhala una cantidad de nicotina equivalente a un cigarrillo por hora suponiendo que tiene un requerimiento de 1 m^3 de aire por hora (26). Los efectos que tiene un ambiente de este tipo puede ocasionar en los fumadores involuntarios desde una leve irritación de los ojos o de garganta hasta un ataque de angina de pecho o un cuadro asmático de tipo alérgico. En niños expuestos constantemente al humo se presenta mayor incidencia de infecciones respiratorias que en los adultos, ya que estos tienen una mayor ventilación pulmonar por minuto (38)

Los estudios sobre la inmunogenicidad del tabaco realizados recientemente han demostrado que esta planta (hojas de tabaco, extracto

Figura 1.- CAMBIOS INMUNOPATOLÓGICOS MÁS FRECUENTES LIGADOS AL TABAQUISMO



to salino de tabaco y condensado de humo de tabaco) contiene compuestos capaces de inducir una respuesta inmune humoral (2,8,10, 11,16,23,25). Harkavy (11,14) demostró que los extractos salinos de tabaco inyectados intraperitonealmente inducían una respuesta inmune humoral antitabaco. Posteriormente Chu y col. (8) verificaron que algunos componentes presentes en el extracto de tabaco también eran inmunogénicos para los conejos. Leher y col. (16) demostraron la capacidad inmunogénica del condensado de humo del tabaco al inyectarlo en conejos y obtener sueros antitabaco en estos conejos inmunizados. Las "precipitinas" contra tabaco se encontraron en el suero inmune y presentaron una movilidad electroforética y peso molecular correspondiente a las inmunoglobulinas (16). Estos resultados apoyan que el humo del tabaco contiene compuestos capaces de inducir una respuesta inmune humoral en conejos (2,8,16). Becker y col. (2,3,4) aislaron y purificaron una glicoproteína de 18,000 daltones de PM con 0.3% de Fe++, a partir de tabaco procesado y del condensado de humo del cigarrillo con la cual inocularon a conejos obteniéndose anticuerpos contra tabaco de clase IgE e IgG específicos contra esta glicoproteína (2). Al inyectar intracutáneamente este material purificado a 31 voluntarios fumadores, 20 de ellos presentaron hipersensibilidad inmediata. Por reacciones de inhibición de la hemaglutinación pasiva se ha demostrado que una sustancia con movilidad electroforética similar a la glicoproteína de 18,000 daltones aislada por Becker se encuentra presente, además del tabaco, en otros miembros de la familia Solanáceae como la berenjena, el pimentón, la papa y el jitomate, demostrándose que estos contienen antígenos de reacción

cruzada con la glicoproteína o que tienen el mismo antígeno(s) (12,15).

Por reacciones de doble inmunodifusión se ha demostrado la existencia de anticuerpos contra antígenos del tabaco en el 11% de una población de 361 fumadores sanos de ambos sexos, la positividad fue independiente de la duración del hábito y del número de cigarrillos consumidos diariamente (31,32,33,34). También se encontraron estos anticuerpos en el suero de algunas personas que habían dejado de fumar durante algún tiempo, pero no fueron detectados en ninguno de los no fumadores (31,32):

Lo anteriormente mencionado demuestra que la formación de los anticuerpos contra antígenos del tabaco se debe a la estimulación antigénica provocada por los compuestos provenientes del mismo y pueden dar lugar a una reacción de hipersensibilidad en algunos individuos (33)

Los sueros de 70 pacientes con isquemia o IAM (infarto agudo al miocardio), de los cuales 49 fueron fumadores y 21 no fumadores, fueron probados contra cuatro diferentes extractos antigénicos de tabaco por reacciones de doble inmunodifusión, encontrándose la presencia de anticuerpos antitabaco en 13 de los pacientes fumadores mientras que los no fumadores fueron negativos. Paralelamente a estos estudios a todos los pacientes se les practicaron pruebas intracutáneas usando los cuatro diferentes extractos antigénicos de tabaco, determinándose que las reacciones que se presentaban entre 6-8 hrs. fueron específicas y más frecuentes e intensas en los fumadores que presentaban "precipitinas" antitabaco en el suero. La presencia de anticuerpos precipitantes se correlacionó

con las reacciones cutáneas tardías. Estos hechos indican la posible existencia de una hipersensibilidad tipo III contra el tabaco en cierto número de pacientes con enfermedad coronaria(31,32,33)

En fumadores con enfermedad arteriocoronaria se encontró hipersensibilidad tipo III al tabaco y algunos trastornos inmunológicos como el incremento de inmunoglobulinas y la disminución de los niveles de complemento sérico como C3 y C4 sugiriendose la presencia de complejos inmunes circulantes en los pacientes estudiados(33,34).

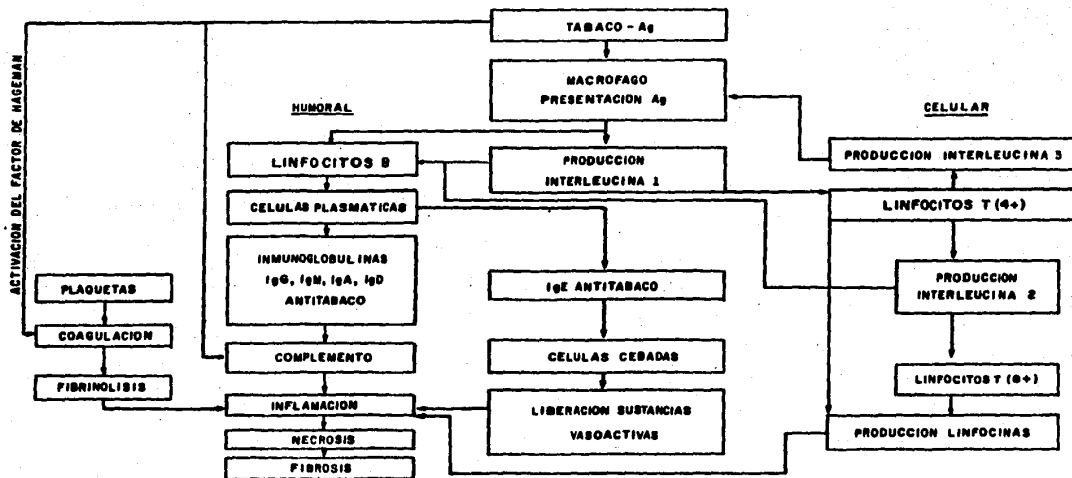
Los complejos inmunes están involucrados en el desarrollo de lesiones inflamatorias de pacientes y animales experimentales(32). También se ha demostrado que estos complejos inmunes pueden depositarse en las paredes vasculares o estar circulando en la sangre de pacientes arterioscleróticos lo cual puede jugar un papel significativo en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de las enfermedades cardiovasculares(1,26,27).

Estudiando el efecto de la respuesta inmune celular contra el tabaco en 80 sujetos aparentemente sanos, 45 de ellos fumadores y 35 no fumadores, se observó que todos produjeron el factor inhibidor de la migración de leucocitos, utilizándose un extracto de tabaco como antígeno. Se encontró que los fumadores y no fumadores liberan una cantidad similar del factor inhibidor de la migración de leucocitos, concluyéndose que el inmunógeno contenido en el humo del tabaco induce una respuesta inmune en un alto porcentaje de la población, aunque esta no fume activamente(5); sin embargo aún se requiere establecer si el factor fue liberado por otros compuestos no antigénicos que tienen efectos farmacológicos directos sobre los linfocitos.

Con anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes subpoblaciones de linfocitos T: OKT3,OKT4,OKT6,OKT8, se encontró que la relación de linfocitos OKT4/OKT8 estaba disminuída en los fumadores comparativamente con los no fumadores o fumadores moderados. La disminución de la población de los linfocitos OKT4, que corresponden a la subpoblación de linfocitos inductores y/o cooperadores, y el incremento de los linfocitos OKT8, que son citotóxicos y/o supresores, dan lugar a la depresión de la respuesta inmune (9).

El antígeno(s) del tabaco interacciona con los sistemas de amplificación del proceso inflamatorio y puede activar la coagulación a través de la modificación del factor de Hageman y éste a su vez tiene relación con los productos activos del sistema inmune y del sistema del complemento. (3). Un compuesto de 1000 daltones presente en el condensado de humo activa al complemento por la vía alterna a partir del tercer componente del complemento (34). Los mecanismos propuestos de la interacción del tabaco con la respuesta inmune y con otros sistemas de amplificación inflamatoria se resumen en la figura 2.

Figura 2: TABAQUISMO Y SU RELACION CON LA RESPUESTA INMUNE



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al efectuarse la combustión del cigarrillo, los antígenos del tabaco son arrastrados por la succión del humo generado y al ponerse en contacto con la superficie de los bronquios del parénquima pulmonar y del sistema inmune del huésped son capaces de inducir una respuesta inmune humoral.

El objetivo de este trabajo es: demostrar que el humo del tabaco producido durante la combustión del cigarrillo arrastra proteínas (como ocurre con la ASB colocada en los cigarrillos) a través de las regiones de menor temperatura del cigarrillo; aproximadamente 60°C en la parte media y en el extremo opuesto a la combustión que está en contacto más directo con la persona fumadora (37°C) y que al llevarse a cabo este fenómeno estas moléculas conservan sus propiedades inmunoquímicas, demostrándose esto por las técnicas inmunoserológicas cualitativas y cuantitativas como la CIEF, IEF, inhibición de la hemaglutinación pasiva e inmunodifusión radial.

HIPOTESIS

Si en el humo producido durante la combustión del cigarrillo se arrastran proteínas antigénicas sin que éstas sufran descomposición o que sea mínima, entonces si colocamos una proteína, como la ASB, en un cigarrillo y después se inicia la combustión en un extremo del cigarrillo la albúmina presente en la parte media y en el extremo opuesto a la combustión, será arrastrada con el humo

del tabaco y pasará a formar parte del CH desnaturalizándose en proporción mínima, lo cual podrá demostrarse por técnicas inmunoserológicas cualitativas y cuantitativas usando sueros anti-ASB para revelar a la ASB.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon dos series de cigarrillos para cada experimento: a una de estas series se le denominó experimental y se le aplicó la albúmina sérica bovina en la siguiente forma:

Al cigarrillo No.1 se le inyectó un volumen total de 3 ml de la dilución de ASB distribuido en tres puntos diferentes dejando una concentración total de 330 mg/cigarrillo. De esta manera se prosiguió con los siguientes cigarrillos usando concentraciones menores de ASB (tabla No.1). La otra serie de cigarrillos que sirvió de control no recibió ASB pero sí se le aplicó un volumen similar de solución salina.

Las diversas series de cigarrillos se dejaron secar durante 48 hrs a temperatura ambiente, al término de este tiempo se procedió a llevar a cabo la combustión y condensación de humo de cada uno de los cigarros (experimentales o testigos) en un volumen de 10 ml de SSF a una temperatura de 4°C y dejando un tiempo de condensación de 10 min. para cada uno (figura 3).

También se llevó a cabo la combustión de tres cigarrillos experimentales con la misma concentración de ASB cada uno, o testigos sin ASB, en un volumen de 10 ml de SSF dejando un lapso de 10 min entre la combustión de uno y otro cigarrillo para favorecer la condensación de humo a una temperatura de 4°C. En forma parecida

se procedió con los otros cigarrillos usando concentraciones menores de ASB.

A cada condensado de humo obtenido se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (19) y sus propiedades inmunoquímicas, procediéndose a llevar a cabo las siguientes pruebas inmunoserológicas: contra inmuno electrophoresis, inmuno electrophoresis, hemaglutinación pasiva, inhibición de la hemaglutinación pasiva e inmunodifusión radial.

Tabla 1. -- Concentración de albúmina serica bovina aplicada a cada grupo de cigarrillos.

Cigarrillos/serie	Concentración de ASB adicionada en cada punto mg/ml	Concentración total de ASB por cigarrillo: mg
1	110.0	330.0
2	55.0	165.0
3	27.0	81.0
4	13.0	39.0
5	6.5	19.5
6	3.2	9.6
7	1.6	4.8
8	0.8	2.4
9	0.4	1.2
10	0.2	0.6

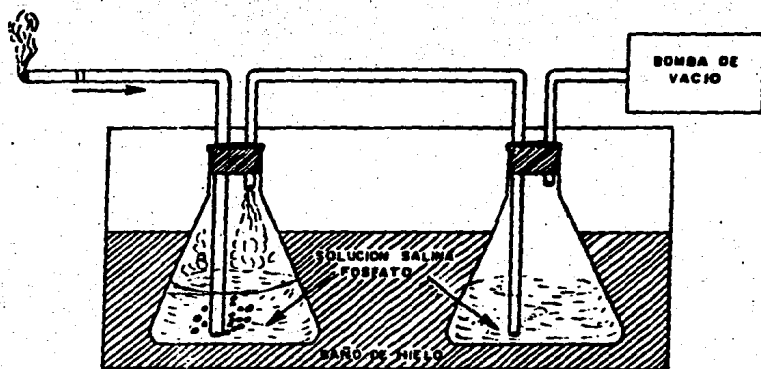


Figura 3 - SISTEMA DE CONDENSACION DEL HUMO DE CIGARRILLOS

MATERIAL Y METODOS.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

- 1.- Se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (ASB) haciéndose diluciones de ésta para obtener las concentraciones de 110, 55, 37.5 y 6.8 µg/ml.
- 2.- Las muestras problema se diluyeron 1:10 y 1:20 con solución salina boratos 0.15M pH 8.4.
- 3.- Se tomaron 0.1 ml de las diferentes diluciones de albúmina y de las muestras problema por duplicado así como 0.1 ml de solución salina borato para preparar el blanco.
- 4.- Se adicionaron 2 ml de la solución A a cada uno de los tubos agitándose inmediatamente. Se dejaron reposar estos por 10 min. a temperatura ambiente.
- 5.- Se agregaron 0.2 ml de la solución B, se mezclaron bien cada una de las muestra y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min.
- 6.- Se midió la densidad óptica tanto de la curva patrón como de los problemas en un espectrofotómetro a 750 nm.
- 7.- Se hizo una curva estandar sobre la cual se extrapolaron los resultados problema y se hicieron los calculos correspondientes para expresar las cantidades en mg/ml.

Soluciones empleadas:

Solución A

tartrato de sodio a 2%	0.1 ml
Sulfato de cobre al 1%	0.1 ml
Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N	10 ml

Solución B

Reactivo de fenol	1.0 ml
Agua destilada	1.0 ml

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

- 1.- Se disolvió agarosa al 0.8% en solución reguladora para CIEF(v/v) con agua desionizada, agregando 0.1% de azida desodio como conservador en baño María a 92°C.
- 2.- Se colocaron 3 ml de agarosa fundida por laminilla dejandola gelificar durante 30 min a temperatura ambiente.
- 3.- Las placas se guardaron en una cámara húmeda a 4°C hasta el momento de usarse.
- 4.- Con un horadador se hicieron seis pares de orificios en cada laminilla.
- 5.- Se extrajo la agarosa de ellos y se procedió a llenarlos con los antígenos y anticuerpos correspondientes así como con las muestras experimentales. En una de los pozos se adicionó azul de bromofenol-ASB como indicador del corrimiento electroforético.
- 6.- Las placas se colocaron en la cámara de electroforésis quedando los antígenos y muestras experimentales en la región catódica y el anticuerpo en la anódica. El contacto con la solución de barbital se llevó a cabo usando tiras de papel filtro.
- 7.- La fuente de poder fue conectada a la cámara de electroforésis y se pasó una corriente de 2.0 mA por cada laminilla hasta que el indicador recorrió 2.5 cm a partir del punto de aplicación.
- 8.- Las placas fueron incubadas 1 día a temperatura ambiente en cámara húmeda y posteriormente fueron lavadas con solución salina borato (0.15M pH 8.4) durante 5 días a 4°C realizandose dos cambios de esta solución.

- 9.- Las placas se dejaron 2 hr en agua destilada.
- 10.-Las placas se cubrieron con papel filtro y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 hrs.
- 11.-Las placas se tiñeron con azul brillante de Coomassie durante el tiempo necesario (aproximadamente 10 min) y se contrastaron con la solución decolorante.
- 12.-Se registraron las bandas de precipitación obtenidas.

INMUNOELECTROFORESIS.

- 1.- Se licuó agarosa al 0.8% en solución reguladora para IEF diluida(v/v) con agua desionizada, agregando 0.1% de azida de sodio como conservador, en un baño de agua a 92°C.
- 2.- Se colocaron 3 ml de agarosa fundida por laminilla, dejando se gelificar durante 30 min a temperatura ambiente. Las placas fueron guardadas en cámara húmeda a 4°C hasta el momento de su uso.
- 3.- Con un cortador se realizaron perforaciones para los pozos y canales. La agarosa se retiró de los pozos para colocar en su lugar a los antígenos correspondientes.
En uno de los pozos se adicionó azul de bromofenol-ASB como indicador del corrimiento electroforético.
- 4.- Las placas fueron colocadas en la cámara de electroforesis usandose solución de barbital como amortiguador.
El contacto del amortiguador con la agarosa se estableció mediante papel filtro.
- 5.- Se cubrió la cámara de electroforesis y fue conectada a la fuente de poder; se pasó una corriente de 2.5 mA por cada lami-

nilla. El corrimiento del indicador fue de 2.5 cm a partir del punto de origen.

6.- Las laminillas fueron retiradas de la cámara de electroforesis eliminandose el gel de los canales.

7.- Cada canal fue llenado con 100 µl del suero inmune correspondiente.

8.- Las placas se incubaron por 3 días a 20°C en cámara húmeda para que se llevara a cabo la inmunodifusión.

Las placas se lavaron en solución salina borato (0.15M pH.8.4) durante 5 días a 4°C realizando dos cambios de esta solución. y después se dejaron 2 hrs en agua destilada.

9.- Las placas se cubrieron con papel filtro y se dejaron secar.

10.- Las placas fueron teñidas con azul brillante de Coomassie y se contrastaron con la solución decolorante.

11.- El número de bandas de precipitación fue registrado.

HEMAGLUTINACION PASIVA

a) Sensibilización de globulos rojos.

Se realizó el acoplamiento de ASB a eritrocitos humanos del grupo sanguíneo "O" Rh(+) por medio de glutaraldehído al 2% ; como controles se usaron eritrocitos sometidos a mismo tratamiento de fijación pero sin añadir ningún antígeno.

1.- La sangre con anticuagulante se centrifugó a 500 g. durante 5 min desechandose el plasma. El paquete de globulos rojos fue lavado 3 veces con solución salina fosfato (SSF) 0.15M pH7.3 centrifugando a 500 g /5 min cada vez.

Los eritrocitos fueron resuspendidos al 50% en la misma solución amortiguadora.

Tabla 13 .- Procedimiento de sensibilización de globulos rojos por medio de glutaraldeido al 2%.

	E-Solos	E-ASB
Eritrocitos al 50%	1.5 ml	1.5 ml
Solución salina Fosfato(0.15M,pH 7.3)	48.0 ml	47.3 ml
Albúmina serica bovina al 22%	-	1.5 ml
Glutaraldeido al 2% en SSF	1.5 ml	1.5 ml
-Se agitaron durante 60 min a 20°C		
-Se centrifugaron a 500 g por 5 min		
-El paquete de globulos rojos fue lavado dos veces con SSF.		
Los eritrocitos se resuspendieron en glicil-glicina		
al 0.35% en SSF 0.15M pH 7.3	30.0 ml	30.0 ml

La suspensión de eritrocitos se agitó durante 1 hr a temperatura ambiente y se dejó a 4°C durante toda la noche.

Los eritrocitos fueron centrifugados y resuspendidos con 75 ml de SSF(0.15M , pH 7.3) con 0.1% de azida de sodio como conservador y 0.1% de gelatina.

b) Determinación de anticuerpos y antígenos por microhemaglutinación.

En placas para microtitulación en fondo en "U" se colocaron por triplicado 50 µl del suero anti-ASB en la primera hilera de pozos en las siguientes hileras se adicionaron 25 µl de SSF-Az-Gelatina y se realizaron diluciones al doble con el microdilutor.

A cada dilución del suero se le adicionaron 25 µl de eritrocitos sensibilizados con ASB.

Controles requeridos:

A) Control del diluyente:

1.- Se depositaron 25 µl de SSF-Az-Gelatina en una hilera de pozos y se agregaron 25 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados al 1.0%. Esta reacción fue negativa.

B) Control del suero:

1.- Se probaron las mismas diluciones del suero problema con eritrocitos sin sensibilizar. Esta reacción fue negativa.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION PASIVA CON ASB Y CONDENSADO DE HUMO DE TABACO CON Y SIN ASB.

En placas para microtitulación con fondo en "U" se colocaron en el primer pozo de cada una de las hileras 50 µl de una solución estandar de ASB con una concentración de 2.2 mg/ml, o CH de tabaco experimental con ASB o CH testigo, en las siguientes hileras de pozos se adicionaron 25 µl de SSF-Az-Gelatina y se realizaron entonces diluciones al doble con el microdilutor.

A cada una de las diluciones de ASB o del CH, se les adicionó 25 µl de una dilución 1:500 del suero anti-ASB del conejo No.1 (previa-

mente se probaron diferentes diluciones del suero anti-ASB determinandose que la dilución óptima para ésta prueba era de 1:500, con la cual se detectó una concentración mínima de 6.8 a 13.6 $\mu\text{g/ml}$ de ASB).

Las placas se incubaron a 37°C durante 30 min, agitandose cada 10 min. A cada uno de los pozos se le adicionaron 25 μl de eritrocitos sensibilizados (E-ASB). Las placas se agitaron y se dejaron reposar durante 3 hrs. a temperatura ambiente .

Controles requeridos:

A) Control del diluyente:

Se depositaron 25 μl de SSF-Az-Gelatina en una hilera de pozos y se agregaron 25 μl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados al 1.0%. Esta reacción fue negativa.

B) Control del suero:

Se probaron las diluciones del suero del conejo No.1 (1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500) con eritrocitos sensibilizados (E-ASB). Esta reacción fue negativa.

INMUNODIFUSION RADIAL.

- 1.- Se disolvió agarosa al 1.6 % en solución reguladora de Mancini agregando 0.1% de azida de sodio como conservador, en un baño de agua a 80°C durante 60 a 90 min, filtrándose posteriormente a través de una gasa.
- 2.- Se dejó enfriar a una temperatura de 45 a 50 °C y se adicionó el suero anti-albúmina en diferentes diluciones: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. A 4 ml de agarosa al 1.6% se le añadió un volumen de 4 ml de la dilución correspondiente de suero anti-ASB mezclándose con la agarosa.
- 3.- Se colocaron 8 ml de la muestra a cada caja de IDR y se dejó enfriar y gelificar a temperatura ambiente durante 30 min. Se guardaron las placas en una cámara húmeda a 4°C hasta el momento de usarse.
- 4.- Se practicaron horadaciones en el agar y en cada una de ellas se colocó un volumen de 10 µl de la albúmina estandar a diferentes concentraciones, así como de las muestras experimentales.
- 5.- El estandar y los problemas se dejaron difundir durante 72 hr. a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 6.- Se lavaron las placas en solución salina borato (0.15M pH 8.4) durante 5 días a 4°C haciéndose dos cambios de la misma.
- 7.- Al cabo de este tiempo se procedió a medir el diámetro de las zonas de precipitación de las diferentes diluciones del antígeno estandar usando una regla que dió los valores en mm elevados al cuadrado.

7.- Para trazar la curva estandar de la placa se utilizó una hoja de papel milimétrico: en el eje de las abscisas se colocaron los valores de la concentración de cada una de las diluciones del antígeno estandar en mg/ml y en el eje de las ordenadas se colocaron los valores correspondientes a la cifra obtenida al cuadrado de la zona de precipitación de cada dilución. Así se obtuvieron los puntos de la curva que al unirse dieron una línea recta, cuyo punto de inserción en el eje de las ordenadas fue de 9 mm. Este punto fue constante para todas las placas usadas y correspondió al diámetro de los pozos en los que se colocaron los antígenos.

Para determinar la concentración del antígeno en las muestras experimentales se procedió a medir en las mismas condiciones que se describieron antes, el diámetro de la zona de precipitación y este valor se situó en el eje de las ordenadas de aquí se trazo una línea recta hasta encontrar la curva estandar y en el punto donde se cruzaron se trazo una línea vertical en el eje de las abscisas que dió directamente la concentración del antígeno en la muestra experimental correspondiente al condensado de humo que contenía la ASB.

SOLUCIONES

SOLUCION SALINA BORATO (SSB) 0.15M 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 o NaOH

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

SOLUCION REGULADORA SALINA FOSFATO 0.15M pH 7.4 (SSF)

Cloruro de sodio	7.88 g en 900 ml de agua
Fosfato de sodio dibásico	2.12 g en 100 ml de agua
Fosfato de sodio monobásico	0.52 g en 25 ml de agua

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.

**SOLUCION REGULADORA SALINA FOSFATO CON AZIDA DE SODIO
pH 7.2 (SSF-Az)**

Fosfato de sodio dibásico anhidro 0.01 M

Fosfato de sodio monobásico anhidro 0.01 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 añadirle el azida de sodio.

SOLUCION 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 de Coomassie con el metanol y agitar durante 24 hr a 20°C en frasco ambar.

Filtrarlo y adicionarle el ácido acético glacial y el agua.

Guardarlo en frasco ambar a 20°C.

SOLUCION DECOLORANTE.

Acido acético glacial 50 ml

Metanol 50 ml

Glicerol 10 ml

Agua destilada c.s.p. 1000 ml

RESULTADOS

CARACTERIZACION DE LA REACTIVIDAD DE LOS SUEROS ANTI-ASB

Los sueros anti-ASB obtenidos (conejo 1 y conejo 2), fueron probados frente a una solución estandar de ASB por las técnicas de CIEF, IEF y hemaglutinación pasiva, obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla II.

Por CIEF se determinó, que la concentración mínima de ASB detectada por el suero anti-ASB de ambos conejos (conejo 1 y conejo 2), fue de 13.0 a 25.0 $\mu\text{g/ml}$, mientras que por IEF sólo se detectaron concentraciones mayores a 52 $\mu\text{g/ml}$ de ASB debido a que ésta técnica es menos sensible que la CIEF. Con ambas técnicas se obtuvieron hasta dos bandas de inmunoprecipitación.

Por la técnica de hemaglutinación pasiva el suero anti-ASB del conejo No.1, presentó un título de 1:1024, y el suero del conejo No.2 presentó un título de 1:520.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA EN EL CH DE CIGARRILLOS EXPERIMENTALES Y TESTIGOS.

Se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteínas tanto a los CH experimentales tratados con diferentes concentraciones de ASB, así como a los CH testigos tratados sólo con solución salina. A los resultados que se obtuvieron de ésta determinación para los CH de un sólo cigarrillo en el que el humo del tabaco producido fue condensado en 10 ml de solución salina, se le restó la concentración promedio de proteína del CH testigo (1.3 mg/ml) para obtener una concentración total de proteína, obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla III.

Como se puede observar el rango de proteína total promedio estuvo comprendida entre 0.23 y 1.88 mg/ml, correspondiendo las concentraciones más altas de proteína a los CH No.8,9,10 provenientes de cigarrillos tratados con concentraciones altas de ASB(330,165 y 81 mg). Para los CH de cigarrillos tratados con concentraciones menores a 19.5 mg de albúmina, la concentración de proteína total promedio fue muy similar, teniendo un rango de concentración de 0.23 a 0.45 mg/ml de proteína.

Los resultados de esta determinación para los CH de tres cigarrillos, es decir para aquellos en los que tres cigarrillos con la misma concentración de ASB se quemaron uno después de otro con un lapso de 5 min entre cada uno y el humo del tabaco producido por los tres se condensó en un sólo volumen de 10 ml de solución salina, se muestran en la tabla III.

De acuerdo con los resultados, para el CH de tres cigarrillos se tiene un rango de concentración que va de 5.2 a 10.6 mg/ml, correspondiendo la concentración más alta para el CH No.1 proveniente de tres cigarrillos tratados con una concentración total de 990 mg de ASB. La concentración promedio de proteína para el CH testigo en este experimento fue de 3.8 mg/ml.

DETERMINACION DE ASB EN EL CH POR LA TECNICA DE CIEF

Los CH experimentales y testigos fueron probados frente a los sueros anti-ASB obtenidos de los conejos 1 y 2 por la técnica de CIEF. Los resultados de esta determinación para los CH de 1 y 3 cigarrillos respectivamente se presentan en la tabla IV.

Como se puede ver en los resultados los sueros anti-ASB de ambos conejos revelan la presencia de esta proteína en los siguientes

porcentajes:

1) El suero del conejo No.1 reveló la presencia de ASB en el 100% de los CH No.1 y 2 provenientes de cigarrillos tratados con 330 y 165 mg de albúmina respectivamente y sólo en el 40% del CH No.3 de cigarrillos a los cuales se les aplicó una concentración de 81 mg de ASB.

2) El suero del conejo No.2 detectó la presencia de albúmina en el 100% del CH No.1 y sólo en el 22% del CH No.2.

Con respecto al CH de tres cigarrillos enfrentados al suero anti-ASB, el suero del conejo No.1 mostró la presencia de albúmina desde el CH No.1 (la concentración total de ASB aplicada fue de 990.0 mg) hasta el CH No.5 (la albúmina total aplicada fue de 58.5 mg). El suero del conejo No.2 evidenció la albúmina desde el el CH No.1 hasta el CH No.4. Los CH obtenidos de un sólo cigarrillo y que provienen de cigarrillos a los que se les aplicó una concentración menor a 81 mg de ASB presentaron una reacción negativa frente a ambos sueros (Figura 4-A).

Los CH testigos no mostraron reactividad frente al suero anti-ASB, al realizar ésta prueba se utilizó un control positivo: se probó una solución patrón de ASB al 22% frente al suero de ambos conejos, presentandose en ambos casos una reacción positiva.

DETERMINACION DE ASB EN EL CH POR LA TECNICA DE I.E.F.

Todos los CH al igual que una solución patrón de ASB, fueron probados frente al suero anti-ASB de los conejos 1 y 2 obteniendose los resultados que se presentan en la tabla V.

Los resultados de positividad de los CH por ésta reacción son los siguientes:

- 1) Con el suero anti-ASB del conejo No.1 se obtuvo un 100% de positividad para el CH No.1 y sólo un 44% de positividad para el CH No.2
- 2) Con el suero anti-ASB del conejo No.2 se presentó un 44% de positividad para el CH No.1

Con respecto a los CH de tres cigarrillos, con el suero No.1 se presentó positividad desde el CH No.1 hasta el CH No.4 y con el suero No.2 se tuvo reacción positiva hasta el CH No.3.

En todos los casos positivos, se observó una sola banda de inmunoprecipitación que presentó el mismo corrimiento inmunoeléctroforético que la solución patrón de ASB usada para ésta prueba y que además fue empleada para inocular a los conejos No.1 y 2 (figura 4B). Los CH testigos no presentaron reacción positiva al enfrentarlos a los sueros anti-ASB.

La frecuencia de positividad para ésta prueba disminuyó con respecto a la CIEF, debido a que es una técnica menos sensible y se requiere una mayor concentración de antígeno para que éste pueda ser detectado (tablas IV y V).

Se puede concluir, que la ASB se encuentra presente en algunos de los CH experimentales y que esta proteína no presenta alteraciones en sus determinantes antigénicos, ya que ha sido reconocida por anticuerpos específicos.

CUANTIFICACION DE LA ASB PRESENTE EN LOS CH EXPERIMENTALES POR LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION PASIVA.

Por medio de esta técnica, se realizó la cuantificación de la ASB

contenida en los CH experimentales utilizando para ello solamente el suero anti-ASB del conejo No.1. Al realizar la estandarización de esta técnica se determinó que la dilución óptima del suero anti-ASB a usar era de 1:500. La concentración de albúmina obtenida para cada uno de los CH experimentales se presentan en la tabla VI.

La concentración máxima de ASB detectada en los CH de un sólo cigarrillo correspondió en promedio al CH No.1 que presentó una concentración de 50.0 µg/ml de albúmina, esta concentración fue disminuyendo para los siguientes condensados (CH No.2:27.5, CH No.3:14.48) hasta encontrar una concentración mínima de albúmina en el CH No.4 y que fue en promedio de 2.9 µg/ml.

Para los CH de tres cigarrillos, la concentración máxima de ASB encontrada fue para el CH No.1 (110.0 µg/ml), esta concentración fue disminuyendo hasta obtener para el CH No.5 una concentración de 13.75 µg/ml.

Se estableció además que la concentración mínima de ASB estandar detectada usando esta dilución del suero anti-albúmina era de 6.5 a 13.0 µg/ml. En los CH testigos la reacción de inhibición de la hemaglutinación pasiva fue negativa.

CUANTIFICACION DE LA ASB PRESENTE EN LOS CH POR LA TECNICA DE INMUNODIFUSION RADIAL.

Al llevar a cabo la estandarización de esta técnica, se determinó que la dilución adecuada del suero anti-ASB del conejo No.1 a usar era de 1:16. Al efectuar la cuantificación de albúmina en los CH experimentales se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla VII.

De acuerdo con los resultados que se encontraron para los CH de un sólo cigarrillo, se determinó, que la mayor concentración de albúmina fue obtenida en el CH No.1 y tuvo un promedio de 60.11 µg/ml; la concentración fue disminuyendo en forma casi proporcional para los siguientes condensados (CH No.2:2.35 y CH No.3:15.77 µg/ml de ASB). En los CH provenientes de un sólo cigarrillo tratados con concentraciones menores a 81 mg de albúmina, no se encontró esta proteína usando la inmunodifusión radial (figura 4C).

Al efectuar la cuantificación de albúmina en los CH de tres cigarrillos se obtuvo para el CH No.1 una concentración de 114.0 µg/ml y la concentración menor la mostró el CH No.4 (26.0 µg/ml de ASB). La concentración mínima de ASB aplicada a los cigarrillos y que puede ser así mismo detectada y cuantificada en el CH por las técnicas de inhibición de la hemaglutinación pasiva e IDR es de 39 mg por cigarrillo. Las concentraciones menores de ASB aplicada a los cigarrillos posiblemente puedan ser detectadas en el CH por técnicas más sensibles tal como la técnica inmunoenzimática ELISA.

Tabla No.11.- CARACTERISACION DE LA REACTIVIDAD DE SIEROS ANTI-ALBUMINA SERICA BOVINA

<u>Suero Anti-ASB del conejo No.</u>	<u>Hemaqlutinación pasiva* título</u>	<u>CIFF No.de bandas</u>	<u>Concentración de ASB detectable por CIFF</u>	<u>I.E.F. No.de bandas</u>	<u>Concentración de ASB detectable por I.E.F.</u>
1	1:1024	1-2	13.0 ug/ml	1-2	52 ug/ml
2	1:520	1-2	25.0 ug/ml	1-2	52 ug/ml

* Se emplearon eritrocitos glutaraldehidados y sensibilizados con ASB del grupo sanguíneo "O" Rh positivo al 1.0%

Tabla 111.- DETERMINACION DE PROTEINA EN EL CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRILLOS TRAFADOS CON ALBUMINA SERICA BOVINA.

Cigarrillo	Concentración de ASB	Serie No.1			Serie No.2			Serie No.3			X	ds
		A	B	C	A	B	C	A	B	C		
1	330.0	1.60*	2.20	2.20	2.20	2.20	1.65	1.50	2.00	1.45	1.88	0.31
2	165.0	0.30	0.60	1.10	1.00	1.05	1.00	0.80	1.20	1.10	0.90	0.27
3	81.0	0.10	0.60	0.60	1.00	0.90	0.90	0.60	0.35	1.10	0.68	0.30
4	39.0	0.45	0.40	1.30	1.10	0.63	0.90	0.80	0.20	0.80	0.73	0.33
5	19.5	0.30	0.45	0.60	0.75	1.00	1.00	0.60	0.20	1.00	0.65	0.29
6	9.6	0.55	0.45	0.35	1.00	0.30	0.50	0.60	0.35	0.00	0.45	0.25
7	4.8	0.30	0.45	0.20	0.35	0.00	0.65	0.35	0.00	-0.20	0.23	0.25
8	2.4	0.45	0.45	0.35	0.90	0.50	0.00	0.20	-0.20	0.20	0.32	0.30
9	1.2	-0.20	1.10	0.80	0.35	0.35	0.65	0.60	-0.45	0.40	0.40	0.45
10	0.6	0.20	1.20	0.20	0.20	0.20	0.55	0.20	-0.20	0.00	0.28	0.37
	0.0											

* mg/ml

Tabla IV. - Identificación de albúmina sérica bovina en el condensado de humo de tabaco por la técnica de contrainmunolectroforesis.

Condensado de humo del cigarrillo No.	Suero anti-ASB Conejo 1										Suero anti-ASB Conejo 2									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<u>No. de bandas de inmunoprecipitación obtenidas</u>										<u>No. de bandas de inmunoprecipitación obtenidas</u>									
Serie No. 1																				
A	1	1	1*	-	-	-	-	-	-	-	1	1*	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 2																				
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 3																				
A	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 4																				
A	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-

* 13.75 µg/ml de ASB determinados por CIEF.

Tabla V .- Identificación de albúmina serica bovina en el condensado de humo de tabaco por la técnica de inmunolectroforésis.

Condensado de humo del cigarrillo No.	Suero Anti-ASB Conejo 1										Suero Anti-ASB Conejo 2									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	No. de bandas de inmunoprecipitación obtenidas										No. de bandas de inmunoprecipitación obtenidas.									
Serie No. 1																				
A	1	1*	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 2																				
A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 3																				
A	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 4																				
A	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-

* La sensibilidad del método corresponde a 52 µg/ml

Tabla VI.- Cuantificación de albúmina sérica bovina en el condensado de humo de tabaco por la técnica de inhibición de la hemaglutinación pasiva.

Condensado de humo del cigarrillo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie No. 1										
A	55.00*	27.50	13.75	6.80	-	-	-	-	-	-
B	55.00	27.50	6.80	-	-	-	-	-	-	-
C	55.00	55.00	27.50	6.80	-	-	-	-	-	-
Serie No. 2										
A	55.00	27.50	13.75	-	-	-	-	-	-	-
B	37.50	13.75	6.80	-	-	-	-	-	-	-
C	55.00	13.75	13.75	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 3										
A	55.00	27.50	27.50	6.80	-	-	-	-	-	-
B	27.50	27.50	6.80	-	-	-	-	-	-	-
C	55.00	27.50	13.75	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 4	110.00	55.00	55.00	27.50	13.75	-	-	-	-	-
Serie Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Concentración de albúmina sérica bovina en µg/ml

Tabla V 1.1.- Cuantificación de albúmina serica bovina en el condensado de humo de tabaco por la técnica de inmunodifusión radial.

Condensado de humo del cigarrillo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie No. 1										
A	69.0*	48.0	22.0	-	-	-	-	-	-	-
B	48.0	29.0	14.0	-	-	-	-	-	-	-
C	76.0	54.0	30.0	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 2										
A	60.0	38.0	18.0	-	-	-	-	-	-	-
B	42.0	20.0	-	-	-	-	-	-	-	-
C	58.0	26.0	16.0	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 3										
A	66.0	34.0	25.0	-	-	-	-	-	-	-
B	50.0	32.0	-	-	-	-	-	-	-	-
C	72.0	40.0	17.0	-	-	-	-	-	-	-
Serie No. 4	114.0	88.0	52.0	26.0	-	-	-	-	-	-
Serie Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Concentración de albúmina serica bovina en $\mu\text{g/ml}$

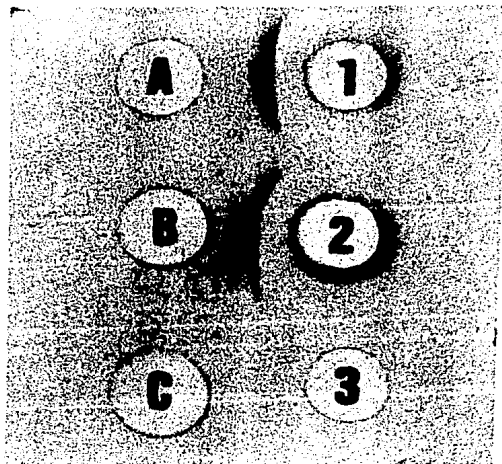


Fig.4A: Se observa por contrainmunolectroforé-
sis una banda de precipitación entre el CH ex-
perimental con ASB (A y B) y el suero anti-
ASB (1 y 2). El CH testigo sin ASB(C) con-
tra el suero anti-ASB (3) no dejó ninguna
banda de precipitación.

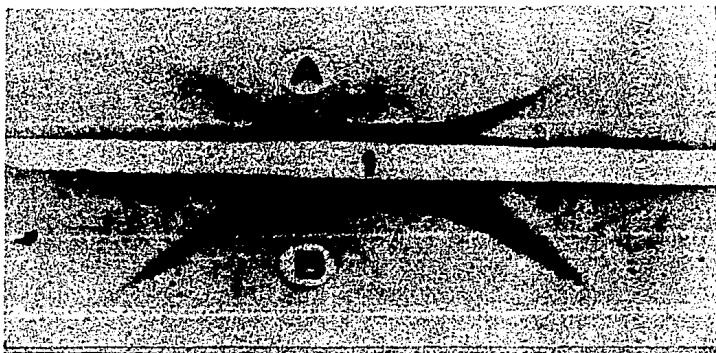


Fig 4B : En la inmunolectroforésis se observó una banda de precipitación al enfrentar el CH experimental con ASB (A y B) contra el suero anti-ASB (canal 1).

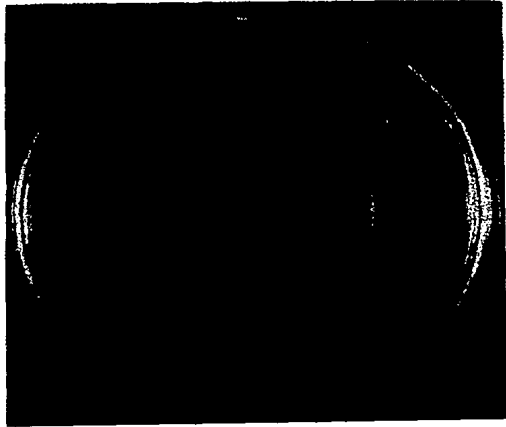


Fig 4C: Se observan los halos de precipitación obtenidos por IDR. Se colocaron cantidades decrecientes de ASB en los pozos 1, 2, 3 y 4. En los pozos 5 a 11 se colocó el CH experimental con ASB resultando positivos los números 5, 6 y 11 el resto fueron negativos.

En el pozo No. 12 se colocó un CH testigo sin ASB. La reacción fue negativa.

La ágarosa contenía el suero anti-ASB diluido 1:500.

DISCUSION

La presencia de ASB en el condensado de humo de cigarrillos a los cuales se les aplicó previamente esta proteína, permite afirmar que en las condiciones de la combustión de los cigarrillos, es posible que una proteína(s) del tabaco pueda estar formando parte del humo, y si esta proteína se pone en contacto con el sistema inmunocompetente del tracto respiratorio, desencadenará la producción de anticuerpos antitabaco. Al incinerar un cigarrillo se destruye el material protéico presente en las hojas del tabaco, sin embargo, se considera que se forma un gradiente de temperatura en este cigarrillo desde la zona de incandescencia (800°C) hasta el sitio que está en contacto con los labios del fumador, lo cual podría originar que el humo del tabaco fuera capaz de arrastrar y contener componentes de bajo peso molecular así como alguna proteína del tabaco, que al introducirse como aerosol en el aire inhalado durante la aspiración del humo, estimularía la respuesta inmune contra los constituyentes del mismo tabaco. Las partículas del humo del tabaco de 10 micras de diámetro, se depositan en vías respiratorias altas como la traquea, ó en conductos respiratorios mayores mediante la sedimentación gravitacional o la fijación a las paredes. Las partículas menores a 0.1 micra llegan a los alveolos gracias a su alto coeficiente de difusión; las de 0.5 micras se mantienen en el aire y son expulsadas mediante la exhalación, mientras que las partículas de una micra tienden a depositarse en las paredes del pulmón que es el sitio donde ocurre el intercambio gaseoso (40). 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 mayor penetración de este material en

el pulmón que la respiración por vía nasal, de manera que las condiciones del ambiente pueden influir en el riesgo de padecer o no, una enfermedad por los agentes respirados(26).

El fumador puede retener hasta el 80 o 90% de las partículas contenidas en el humo cuando la inhalación es sostenida durante dos a cinco segundos(6).Leher(17) utilizó tres productos de la hoja de tabaco procesado y precipitando las proteínas con sulfato de amonio, comprobó por inmunodifusión que los extractos son inmunogénicos para conejos; así mismo demostró la capacidad inmunogénica del CH de tabaco al inyectarlo en conejos y obtener sueros anti-tabaco en los conejos inmunizados. Gleich(10) utilizó hojas de tabaco procesadas y condensado de humo haciendo las extracciones con eter de petroleo, al analizar sus muestras por electroforésis en geles de poliacrilamida-SDS, el CH presentó proteínas de 11 y 14 Kd, y tres de 60 a 90 Kd, estos productos fueron inmunogénicos para el conejo. Harkavy(11) demostró que un extracto crudo de tabaco fue inmunogénico para conejos, Chu(8) también utilizó un extracto crudo de tabaco y obtuvo hasta tres bandas de precipitación por CIEF al enfrentar el extracto al antisuero de conejos. Morales(1985) y Preciado(1984) utilizaron cigarrillos comerciales para obtener extractos salinos y condensado de humo demostrando por medio de CIEF que son inmunogénicos para conejos. Moreno(1986) puso de evidencia la presencia de anticuerpos contra el CH y contra el antígeno homólogo en conejos inmunizados con extracto salino de tabaco. Dos de cinco conejos inmunizados con el condensado de humo, produjeron anticuerpos contra este y todos contra el extracto salino.

En base a la información anterior se concluye que algunos de los productos de tabaco son inmunogénicos en conejos, utilizando diver-

Los antígenos que incluyen la hoja, el tabaco procesado o en forma de cigarrillos, los cuales recibieron diferentes tratamientos y se probaron con distintas técnicas inmunoserológicas, se comprobó que en todos los casos, con mayor o menor positividad los productos del tabaco fueron inmunogénicos para el conejo.

En individuos fumadores y no fumadores se han demostrado anticuerpos antitabaco; los primeros por una exposición activa y los segundos por el contacto pasivo con los productos del tabaco. Becker (2, 3, 4) purificó una glicoproteína de 18 Kd que es inmunogénica para el conejo y el cobayo y que despierta una reacción cutánea de hipersensibilidad inmediata tanto en los individuos fumadores como en los no fumadores. Romansky (31, 32, 33) obtuvo extractos de hoja con diferentes solventes, empleando una parte del pulverizado de la hoja y dos partes del solvente, logró cuatro preparaciones con una concentración similar. Utilizó la doble inmunodifusión para analizar los sueros de 70 pacientes con isquemia o infarto agudo del miocardio de los cuales 49 eran fumadores y 21 no fumadores y también practicó pruebas intracutáneas. En éstas últimas, 41 pacientes fumadores resultaron positivos y 8 fueron negativos y 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 los no fumadores. Morales (24) y Preciado (30) obtuvieron un alto porcentaje de positividad de anticuerpos antitabaco tanto en individuos fumadores como en no fumadores debido probablemente al tipo de extracción y a que la CIEF utilizada fue más sensible que la doble inmunodifusión empleada en otros estudios (25, 30, 31, 32, 33). La información señalada en cuanto a la producción de anticuerpos por sujetos fumadores activos, pasivos, o ambos se explica por la

presencia del antígeno(s) del tabaco en el humo.No es posible descartar en este estudio otras posibilidades como la reacción cruzada con otros antígenos de solanáceas(papa,jitomate,berenjena entre otros) que pudieron intervenir en la inducción de anticuerpos anti-solanáceas,familia a la que pertenece el tabaco(22,25,30).

Un grupo de ratones fueron expuestos al humo del tabaco durante 60 días con una exposición diaria,evaluandose posteriormente la síntesis de anticuerpos antitabaco por la técnica inmunoenzimática (ELISA).Los resultados mostraron que estos ratones desarrollaron una respuesta inmune humoral antitabaco lo cual apoya la presencia de inmunógenos del tabaco en el humo y además de que este material puede desencadenar la producción de anticuerpos que reaccionan con los antígenos extraídos del tabaco o que se encuentran en el condensado de humo(comunicación personal:Rodríguez G.,U.M.E.,Facultad de Medicina,U.N.A.M.,1986).

Los condensados de humo provenientes de cigarrillos a los cuales se les adiciona ASB fueron enfrentados con sueros anti-ASB por la técnica de CIEF dando lugar a una reacción positiva.Se comprobó la presencia de ASB inmunoreactiva en el 100% de los CH No.1 tratados con 330 mg/cigarrillo de albúmina.La frecuencia de positividad disminuyó hasta llegar a 0 en los CH del grupo No.3 provenientes de cigarrillos tratados con una concentración de ASB menor de 81 mg/ cigarrillo.En los CH que se presentó reacción positiva,al igual que en una solución estandar de ASB,se observó una sola banda de inmunoprecipitación,la positividad de la reacción fue mayor para los CH en los que se usaron tres cigarrillo,observandose una banda de inmunoprecipitación hasta el CH de tres cigarrillos tratados con una concentración total de 58.5 mg de ASB.

Por I.E.F. se determinó que el 100% de los CH del grupo No.1 y el 45% de los CH del grupo No.2 presentaban reacción de inmunoprecipitación positiva frente al suero anti-ASB del conejo No.1. La concentración mínima detectable de ASB estandar usando este antisuero -- fue de 100 µg/ml. En todos los casos positivos se presentó una sola banda de inmunoprecipitación con un corrimiento inmunolectroforético similar al que presenta la ASB que se usó para inocular a los conejos y para tratar a los cigarrillos. El número de casos positivos usando IEF fue menor que para la CIEF debido a que esta última tiene mayor sensibilidad. Estos resultados permiten determinar que la ASB se encontraba presente en los CH y que podía ser detectada por los antisueros correspondientes.

La concentración mínima de ASB detectable por la técnica de inhibición de la hemaglutinación pasiva con el suero anti-ASB del conejo No.1 diluido 1:500 fue de 6.8 a 13.6 µg/ml.

Comparando la concentración de ASB presente en los CH con la positividad que presentaron estos CH en la prueba de CIEF, se puede señalar que los CH con una concentración mayor de 14.0 µg/ml de ASB fueron positivos frente al suero anti-ASB del conejo No.1.

Como se puede observar en la tabla VII, los resultados en la concentración de ASB son similares a los obtenidos por la técnica de inhibición de la hemaglutinación pasiva, por lo que es posible indicar que la sensibilidad de ambas técnicas fue similar al usar el suero del conejo No.1.

Con respecto al CH de tres cigarrillos, la concentración fue de 112 µg/ml para el CH No.1 y de 26.0 µg/ml para el CH No.5. La cantidad de ASB aplicada a los tres cigarrillos con los cuales se preparó éste condensado fue de 117 mg.

Comparando estos resultados podemos determinar, que los CH que presentan una concentración mayor a 50 µg/ml de ASB mostraron una reacción positiva por la técnica de IEF frente al suero anti-ASB.

Se debe tomar en cuenta que de la proteína total aplicada al cigarrillo, sólo se recupera entre el 50 y 60% de ella y que la proteína inmunoreactiva representa menos del 1% de la cantidad inicial en el cigarrillo. (Tablas III, IV, V, VI, VII). Esta cantidad es suficiente para desencadenar la respuesta inmune humoral antitabaco y las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgG, IgM o IgE (fig. 1 y 2).

La evaluación estadística se realizó por la prueba de "t" de Student (27). Los resultados fueron divididos en 10 grupos de condensados de humo de acuerdo a la concentración de ASB que se aplicó a cada uno de los cigarrillos. Se realizaron las evaluaciones estadísticas de las combinaciones entre los grupos y sólo se indican aquellas que tuvieron significancia estadística.

Con respecto a los CH provenientes de cigarrillos a los que se les aplicaron concentraciones menores de 39 mg/ml de ASB no se observó una diferencia estadística significativa entre este grupo y el grupo de CH testigo en relación a la concentración de proteínas totales ($p \geq 0.05$). Sin embargo en el grupo CH provenientes de cigarrillos tratados con cantidades mayores a 81 mg de ASB se presenta una diferencia significativa en la concentración de proteínas obtenidas ($p \leq 0.001$). Los resultados alcanzados por la técnica de CIEF entre el grupo CH No. 2 y el grupo CH No. 3 mostraron que fue mayor la frecuencia de positividad de la reacción para el CH No. 2 ($p \leq 0.002$), esto puede deberse a que la cantidad de ASB aplicada al cigarrillo No. 2 fue mayor que la aplicada al cigarrillo No. 3 (165.0 y 81 mg/ml

de ASB respectivamente).

Por IEF se observó una mayor frecuencia de positividad en el CH No.1 que en el CH No.2 ($p \leq 0.001$).

Las diferencias entre el grupo No.1 que pertenece a los CH provenientes de cigarrillos tratados con 330 mg de albúmina y el grupo No.2 provenientes de cigarrillos tratados con 165 mg de ASB fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$) en lo que se refiere a la concentración de ASB. Al comparar los resultados del CH No.2 con el resultado del CH No.3 se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.002$).

Los datos de estos mismos grupos obtenidos por la técnica de IDR nos muestran que también hay una diferencia estadísticamente significativa entre el CH No.1 y el CH No.2 ($p \leq 0.001$), al comparar el CH No.2 con el CH No.3 se observa una diferencia significativa ($p \leq 0.002$).

La prueba de correlación estadística(27) realizada entre los resultados obtenidos de la concentración de protefinas por la técnica de inhibición de la hemaglutinación pasiva y la de IDR mostró la siguiente información: En el grupo CH No.1 la correlación fue de 0.75, para el grupo CH No.2 se presentó una correlación de 0.83 y para el grupo CH No.3 la correlación encontrada fue de 0.84.

Los resultados obtenidos de este trabajo permiten concluir que el humo del tabaco producido durante la combustión del cigarrillo se mezcla con protefinas y otros productos de la degradación del tabaco arrastrandolas a través del cigarrillo y que parte del material proteico sufre una descomposición mínima por la temperatura y otros factores fisicoquímicos. Así mismo estas moléculas pueden ser demostradas y cuantificadas por técnicas inmunoserológicas usando los

anticuerpos correspondientes, lo que apoya su capacidad de inducir una respuesta inmune en animales de laboratorio y posiblemente en personas que esten expuestas al contacto con los productos del tabaco.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barona, P.A., Borunda, O., Luna, J., Ocaña, H. y Quezada, E.: tabaquismo. Rev. Fac. Med. U.N.A.M. (México), 24:6, 1981.
- 2) Becker, C.G., Duvin, T. and Wiedermann, H.P.: Hypersensitivity to tobacco antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 73:1712, 1976
- 3) Becker, C.G., and Duvin, T.: Activation of factor XII by tobacco glycoprotein. J. Exp. Med., 146:457, 1977.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) Braval, L. y Slomianski, R.: Tabaquismo. Información Científica y Tecnológica. 3:27, 1981
- 7) Cano Valle F.: Tabaquismo. Rev. Fac. Med. U.N.A.M. (México): 27:46, 1984
- 8) 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
- 9) Ginns, L.C., Goldenheim, P.D., Willer, L.G., Burton, R.C., Gillick, L., Colvin, R., Goldstein, G., Kung, P.C., Hurwitz, C. and Kozemi, H.: T-Lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry, Am. Rev. Res. Dis., 126:265, 1982
- 10) Gleich, G.J. and Welsh, P.W.: Immunolochemical and physicochemical properties of tobacco extracts, Am. Rev. Res. Dis., 120:995, 1979
- 11) Harkavy, J. Tobacco sensitization in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 36:381, 1937
- 12) Harris, H.: Tobacco sensitivity. Annals of Allergy, 29:608, 1971

- 13) Hutchinson, J.: The families of flowering plants, 2a. ed., Oxford University Press, p. 484, 1959
- 14) Larson, P.S. and Silvette, H.: Tobacco experimental and Clinical studies, Williams and Wilkins Co. p. 553, 1961
- 15) Lawrence, H.M.G.: Taxonomy of vascular plants, 4a. ed., Mac Millan, New York, p. 693, 1959
- 16) Leher, S.B., Wilson, M.R. and Salvaggio, J.E.: Immunogenic properties of tobacco smoke. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 62:368, 1978
- 17) Levi, R.M.D., Zavec, J.H., Burke, J.A.M. 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
- 18) Lisiewicz, J. and Michalczak, W.: Pharmacology and toxicology of cigarette smoke. *Wiadomosci Lekarskie.* 36:1339, 1983.
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951
- 20) 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 1979.
- 21) Martínez, R.D., Białostosky D. y Bassoti, R.: Estudio inmunoserológico en pacientes con infarto agudo del miocardio. I. Análisis inmunoserológico. *Arch. Inst. Cardiol. (Méx.)*, 48:414, 1978
- 22) Martínez R.D., Pérez, M.S., Saldaña, A. y Preciado, A.: Actividad de lectina en extractos de tabaco y de otras solanáceas. XLV Congreso Nacional de Bioquímica Clínica. Guadalajara, Jal. p. 180, 1982
- 23) 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
- 24) Morales, J.J.: Estudio inmunoserológico de los anticuerpos contra antígenos de tabaco y los complejos inmunes tabaco-antitabaco en el infarto del miocardio. Tesis U.N.A.M. ENEP Zaragoza, 1984

- 25) Moreno, A.: Caracterización de los complejos inmunes circulantes tabaco-antitabaco en pacientes con enfermedades pulmonares. Tesis, U.N.A.M., Facultad de Medicina, 1986
- 26) Muramatsu, M., Umemura, S., Okada, T., Yomita, H. Estimation of personal exposure to tobacco smoke with a Newly developed nicotine personal monitor. *Environmental Research*, 35:218, 1984
- 27) Murray, R. S., Estadística. 1a. ed. Mc Graw-Hill, México, 1970
- 28) Peña M. J.: Inmunología, 1a. ed. Ed. Pirámide S.A., Madrid 1982
- 29) Preciado, A. y Martínez R. D.: Estudio Inmunológico del tabaco XIV Congreso Nacional de Bioquímica Clínica, Guadalajara, Jal. p.179, 1982
- 30) Preciado L. A.: El perfil antigénico del tabaco y el analisis de los anticuerpos contra antígenos del tabaco en el infarto del miocardio. Tesis, U.N.A.M., Iztapalapa, Departamento de la Salud .1983
- 31) 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
- 32) 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, *Allergol. Immunopathol.* 6:383, 1978
- 33) Romanski, B., Broda, S., Swiatkowski, M. and Sbukowska-Gotz: The immunological response to tobacco antigens in the smoker III. Type III hypersensitivity skin reactions and specific serum precipitins to four different tobacco extracts in patients suffering from coronary artery disease. *Allerg. immunopathol.* 7:187, 1979
- 34) Romanski, B., Broda, S., Swiatkowski, M., Zbukowska-Gotz.: The immunological response to tobacco antigens in smokers. IV. Plasma concentrations of immunoglobulin and some complement components in tobacco hypersensitivity patients suffering from coronary artery disease. *Allergol. Immunopathol.* 9:847, 1981
- 35) Romanski B., Zbukowska-Gotz, Kakol J. and Sinkiewicz W.: The immunologic response to tobacco antigens in smokers. V

Phagocytosis of tabacco antigens by peripheral blood polymorphonuclear leucocytes studied by immunofluorescence. *Allergol. Immunopathol.* 12:31, 1984

- 36) Rose, N.R. Bigazzi, P.E.: *Methods in Immunodiagnosis*. Ed. Wileyu Son. New York, 1980
- 37) Stites, D.P. Stobs J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.: *Inmunología Básica y Clínica*. 5a. ed. Ed. El Manual Moderno. México 1985
- 38) Tapia, J.R. *Tabaquismo. Salud Pública (Méx)*. 22: 601, 1980
- 39) Willoughby W.F., Willoughby J.B., Cantrell, B.B., Wheelis, R. In vivo responses to inhaled proteins. Induction of Interstitial pneumotitis and enhancement of immune complex-mediated alveolitis by inhaled concanavalin A.
- 40) Zaragoza, J.R. y Llanos, M.: *Tabaco y Salud*. 1a ed., Ed. Ac. Madrid, 1980.