



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ESTUDIO INMUNOSEROLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS
CONTRA ANTÍGENOS DEL TABACO Y LOS COMPLEJOS
INMUNES TABACO - ANTITABACO EN EL INFARTO DEL
MIOCARDIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

JOSEFINA MORALES JUAREZ

MEXICO, D. F.

1984





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.

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
OBJETIVOS	14
HIPOTESIS	15
METODOS DE TRABAJO	18
MATERIAL BIOLÓGICO:	38
I. ANIMALES EXPERIMENTALES	
II. GRUPOS DE INDIVIDUOS	
PREPARACION DE SOLUCIONES	39
RESULTADOS	42
TABLAS	52
FIGURAS	69
DISCUSION	77
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFIA	86

ABREVIATURAS USADAS

PBS	: Buffer de salina fosfato.
SDS	: Dodecil sulfato de sodio.
TW-20	: Tween-20.
TR-X-100	: Tritón-x-100.
TPBS ₁	: Extracto de tabaco con buffer de salina fosfato.
TSDS ₁	: Extracto de tabaco con dodecil sulfato de <u>so</u> dio.
TTW-20 ₁	: Extracto de tabaco con tween-20.
TTR-X-100 ₁	: Extracto de tabaco con tritón-x-100.
TPBS ₂	: Extracto de tabaco con buffer de salina fosfato precipitado con sulfato de amonio.
TSDS ₂	: Extracto de tabaco con dodecil sulfato de <u>so</u> dio precipitado con sulfato de amonio.
TTW-20 ₂	: Extracto de tabaco con tween-20 precipitado con sulfato de amonio.
TTR-X-100	: Extracto de tabaco con tritón-x-100 precipitado con sulfato de amonio.
TPBS ₃	: Extracto de tabaco con buffer de salina fosfato (11.5 mg/ml de proteína).
Conejos A y B:	Conejos inmunizados con extracto de tabaco (TPBS).
Ag	: Antígeno.
Ac.	: Anticuerpo.
SSB	: Buffer salina borato.
ASB	: Albúmina sérica bovina.
GVB	: Buffer de gelatina veronal.
PBS-AZ	: Buffer de salina fosfato con azida de sodio.
PEG 6000	: Polietilén glicol de peso molecular 6000.

TEMED : Tetrametil-etilendiamina.
PAA-SDS : Poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
CIEF : Contraimmuno-electroforesis.
MDID : Microdoble inmunodifusión.
IAM : Infarto agudo del miocardio.
SNC : Sistema nervioso central.
INC : Instituto Nacional de Cardiología.

RESUMEN

Los compuestos nocivos contenidos en el tabaco y su humo bajo sus diversas formas de uso causan daño directo al organismo. La asociación entre el tabaquismo y las enfermedades pulmonares, es muy estrecha y este hábito es un factor de riesgo en la insuficiencia coronaria y en el infarto agudo del miocardio. Lo anterior nos motivó para estudiar la respuesta inmune anti-tabaco. En un modelo experimental se mezclaron los antisueros de conejo con diversos extractos de tabaco obtenidos con PBS, SDS, TW-20 ó TR-X-100 incubándose a 37°C por 30 min., se centrifugaron y el sobrenadante se pasó por Sephacryl S-200. Los sobrenadantes mostraron resultados positivos por CIEF, MDID, hemaglutinación, electroforesis en geles de PAA-SDS y determinación de proteína por el método de Lowry y col., A las fracciones resultantes se les determinó proteína por el mismo método anterior. Los resultados por CIEF y MDID fueron negativos para cada fracción con los diferentes extractos de tabaco tratados con suero inmune. La hemaglutinación fue positiva en algunas de las fracciones hasta 1:8.

Los sueros de pacientes con IAM fumadores y no fumadores fueron positivos por CIEF, por la precipitación con PEG 6000, así como por la electroforesis en gel de PAA-SDS del precipitado. Estos resultados revelaron la presencia de anticuerpos contra tabaco y una proteína de peso molecular aproximado a 18000 daltones que puede corresponder a la glicoproteína del tabaco.

En sujetos normales, los cuales fueron donadores de sangre, fumadores y no fumadores, también revelaron la presencia de anticuerpos contra tabaco pero no de la proteína de peso molecular aproximado a 18000 daltones.

En este trabajo se demostró que existen complejos inmunes -

circulantes en el suero de pacientes con IAM fumadores y no fumadores que reconocen al tabaco y que pudieran ser algunos de los factores patogénicos responsables que intervienen en ciertos casos de insuficiencia coronaria e IAM.

INTRODUCCION

El individuo normal tiene la capacidad de defenderse de los agentes nocivos que encuentra en su medio ambiente, gracias a una serie de mecanismos presentes desde el nacimiento, algunos de los cuales no dependen para su efectividad de experiencias previas con un microorganismo ó antígeno determinado, en tanto que otros sí. A este conjunto de mecanismos de defensa se le llama inmunidad (1).

El sistema inmunológico esta integrado por 2 componentes -- principales: la inmunidad celular y la inmunidad humoral. Es - tos componentes se desarrollan a lo largo de vías de diferen - ciación separadas pero interrelacionadas, donde intervienen di - versos tipos de células y tejidos. El linfocito es la célula - central en inmunología y los estudios realizados han permitido la identificación de 2 poblaciones principales de linfocitos - designados como linfocitos T y linfocitos B (2).

Los linfocitos T (células T) son llamados así porque derivan del timo o son influidos por el durante su desarrollo y son - los responsables de diversas funciones en la inmunidad celular, incluyendo la reacción cutánea retardada, la defensa contra - ciertos microorganismos, el rechazo inmunitario de los injertos y la inmunidad antihumoral (2).

Los linfocitos B (células B) son denominados así debido a - que se desarrollan en la bolsa de Fabricio en las aves y en la médula ósea de algunas especies, quizá incluyendo la humana. Los linfocitos B y su progenie, las células plasmáticas, son - los responsables de las funciones de la inmunidad humoral, la cual se expresa a través de la producción de proteínas plasmáti - cas circulantes de elevado peso molecular denominadas anticuer - pos ó inmunoglobulinas.

Los anticuerpos se originan como respuesta a las sustancias extrañas introducidas en el organismo, las cuales han sido lla

madras inmunógenos ó antígenos (2).

Las inmunoglobulinas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que constituyen del 10 al 20% de las proteínas plasmáticas totales y son llamadas también gammaglobulinas porque en la electroforesis del suero, la mayoría de ellas migran a la zona designada como gamma. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas compuestas de 82-96% de aminoácidos y de 4-18% de carbohidratos, siendo el componente polipeptídico el que posee casi todas las propiedades biológicas asociadas con las moléculas de los anticuerpos. En los humanos existen 5 tipos de inmunoglobulinas que son: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, de los cuales la IgG es la más abundante en el suero.

Los inmunógenos más importantes son las proteínas macromoleculares de peso molecular superior a 100 000, pero los polisacáridos, los polipéptidos sintéticos y otros polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona son inmunógenos en condiciones apropiadas, siendo regla general las moléculas de peso molecular mayor de 10 000 (2).

La síntesis de anticuerpos específicos pueden interactuar con los antígenos que originaron su producción y unirse a ellos por medio de enlaces no covalentes y por las mismas fuerzas de atracción entre las moléculas para formar complejos inmunes. La respuesta inmune tiene el propósito de eliminar y/o neutralizar los antígenos, beneficiando al huésped, como en el caso de algunos virus y toxinas. Sin embargo, no hay duda de que la formación de los complejos inmunes puede ser perjudicial (3).

Los efectos nocivos de los complejos inmunes fueron sugeridos al principio de este siglo por Von Pirquet (3), quien propuso que durante el ataque y el curso de una enfermedad el suero podía tener "factores tóxicos" producidos por la interac --

ción del anticuerpo y del antígeno. Observaciones similares -- fueron hechas posteriormente por Longcope(3), Rich y Gregory - (3) y Hawn y Janeway (4).

El papel patogénico de los complejos inmunes fué demostrado durante los años de 1950 por los trabajos de Germuth (3,5), Dixon y asociados (3,6,7), quienes confirmaron y amplificaron la teoría original de Von Pirquet, usando a conejos en su modelo experimental.

Otras células mononucleares que interactúan con los linfocitos para desencadenar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular son los macrófagos (1). Estas células fagocíticas se originan en los vertebrados de los promonocitos existentes en la médula ósea, circulan en la sangre como monocitos y luego migran a los tejidos. Una vez en los tejidos los monocitos evolucionan a macrófagos (histiocitos) en diversos sitios anatómicos incluyendo la cavidad peritoneal, la médula ósea, el pulmón, el bazo, los ganglios linfáticos y el hígado (células de Kupffer) (2).

Los macrófagos varían grandemente en su tamaño y morfología dependiendo del lugar en donde se encuentren y pueden sobrevivir durante meses en los tejidos. Poseen diversos receptores, enzimas y proteínas transportadoras sobre su superficie celular. Existen, cuando menos 4 grupos generales de receptores de membrana sobre los macrófagos: receptores para la porción Fc de las moléculas IgG1 e IgG3; receptores para fragmentos de C3b; receptores inespecíficos que ligan partículas como las cuentas de látex, aglutinados de proteína, eritrocitos tratados con aldehídos y hemocianina y receptores para lectinas de las plantas, los cuales les son útiles para poder llevar a cabo su función inmunitaria.(2)

Se ha considerado la posibilidad de que los productos del tabaco fueran los causantes de enfermedades, incluyendo algunas en las que intervienen mecanismos inmunológicos (28).

A continuación se describirá una breve historia del tabaco. El tabaco (Nicotina tabacum) es una planta originaria de América pertenece al orden de las Solanáceas y al género Nicotina, del cual existen alrededor de 60 especies, crece en climas cálidos y templados. El tabaco cultivado y usado moderadamente por los indoamericanos, quienes lo fumaban con fines ceremoniales y terapéuticos principalmente en las Antillas, México, Brasil, la Florida y Virginia, fue introducido por los conquistadores del Nuevo Mundo a Europa, primero como curiosidad y después solicitado por poseer un valor medicinal, extendiendo su cultivo y consumo a todo el mundo (8,9,10).

Durante los siglos XVII y XVIII el tabaco fue recomendado como la "panacea", para tratar diversos malestares, desde el dolor de muelas y reumatismo hasta intoxicación sanguínea e indigestión. Por un tiempo el uso del tabaco en forma inhalada fue aceptado, pero después este se usó fumándolo, siendo usado casi exclusivamente por hombres; cuando se fabricaron los cigarrillos en el siglo XX también las mujeres iniciaron el hábito del tabaquismo. Desde entonces el uso del tabaco continúa incrementándose aún con la advertencia de que es perjudicial para la salud (11).

El centro principal de producción del tabaco es Norteamérica, incluyendo México, Canadá y los Estados Unidos, después le siguen China, India, Paquistán, Brasil, la URSS, Japón, Turquía, Grecia y Bulgaria.

Se sabe que las enfermedades crónicas que se presentan generalmente entre los fumadores se hallan en relación directa con

el número de cigarrillos que consumen, además, de otros factores que modifican la cantidad del daño que causa el hábito de fumar, como son: edad a la que se adquiere el hábito; tipo de tabaco y de cigarrillos (el filtro ayuda a mitigar los efectos dañinos); duración del hábito; mantener el cigarrillo en la boca entre fumada y fumada haciendo que la acción de la nicotina sea mayor y fumar el cigarrillo hasta el final, lo que provoca una mayor inhalación de sustancias nocivas. Pero los cigarrillos no solo perjudican a los fumadores, sino también a quienes, sin fumar, tienen que soportar una atmósfera saturada de humo. Pruebas realizadas en Alemania demuestran que una persona no fumadora que se encuentra en sitios de fumadores (restaurantes, cafés, oficinas, etc.), inhala una cantidad de nicotina equivalente a la que se consume fumando un cigarrillo por hora. Los efectos que produciría un ambiente de este tipo dependen de las características del individuo que lo inhala en contra de su voluntad, causando en los adultos desde una irritación de los ojos o la garganta, hasta un ataque de asma o de angina de pecho en personas predispuestas, y en los niños una mayor incidencia de enfermedades respiratorias debido a que tienen una mayor sensibilidad y ventilación pulmonar por minuto y por peso corporal (8).

Estudios realizados por diversos investigadores han demostrado la capacidad antigénica del tabaco y de ellos se hablará a continuación. Harkavy (12,13) demostró que los extractos de tabaco inyectados intraperitonealmente a ratas, "sensibilizaron" sus tejidos y que por lo tanto los extractos eran antigénicos.

Posteriormente Chu y colaboradores (14) demostraron que algunos componentes presentes en el extracto de tabaco de cigarrillos eran antigénicos para conejos.

Más recientemente se ha demostrado que los extractos de hojas, el humo y el condensado de humo de tabaco tienen sustancias capaces de inducir una respuesta inmune humoral (15, 16, 17). Además, se ha purificado una glicoproteína, de peso molecular de 18 000 daltones, que contiene 0.3% de Fe y también se han aislado sustancias semejantes a la quercetina (15,18). Utilizando esta proteína, se ha logrado sensibilizar a conejos, - obteniéndose IgE específica contra la glicoproteína produciéndose reacciones de hipersensibilidad (19,20).

Se ha probado por la inhibición de la hemaglutinación que otros miembros de la familia Solanaceae, incluyendo además del tabaco, a la berengena, al pimentón, a la papa y al jitomate, contienen antígenos de reacción cruzada, con una movilidad electroforética similar a la glicoproteína del tabaco (15).

Romanski y col. (21) demostraron la presencia de anticuerpos contra tabaco por precipitación en gel en un 11.8%, de una población de 361 fumadores sanos de ambos sexos e independientemente de la duración del hábito y del número de cigarrillos consumidos diariamente; los anticuerpos antitabaco también se encontraron en personas que habían dejado de fumar por algún tiempo; pero no observaron estos anticuerpos en los no fumadores sanos; lo anterior indica una estimulación antigénica en los sujetos fumadores provocada por compuestos provenientes del tabaco.

También se demostró la presencia de estos anticuerpos contra tabaco en un 29.34% de una población de 184 fumadores con síntomas de coronariopatía crónica ó IAM (22).

En una población de 70 pacientes con isquemia ó IAM, de los cuales 49 fueron fumadores y 21 no fumadores y trabajando con 4 diferentes extractos de tabaco se encontraron anticuerpos es

pecíficos en el suero de 13 de los pacientes fumadores, pero no en el suero de los no fumadores (23).

En fumadores con enfermedad arteriocoronaria se encontró -- que existe alergia tipo III al tabaco y que algunos cambios inmunológicos, tales como el incremento de inmunoglobulinas y la disminución de los niveles de componentes del complejo sérico como el C3 y C4 sugieren la presencia de inmunocomplejos circulantes en los pacientes estudiados (24).

Existe la evidencia de que los complejos inmunes están involucrados en el desarrollo de lesiones inflamatorias en varios órganos de pacientes y en animales experimentales. También se ha demostrado que estos complejos inmunes pueden ser depositados en las paredes vasculares y estar circulando en la sangre de pacientes arterioescleróticos, los cuales pueden jugar un -- significativo papel en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de enfermedades cardiovasculares (25).

Se encontró que la más alta incidencia de estos complejos inmunes detectados en el suero de pacientes con enfermedades vasculares fue en pacientes con IAM (28%), por lo que se examinó seriamente los cambios en la concentración de estos complejos inmunes desde el primer día del ataque del infarto hasta -- el final de la tercera semana del período de observación, por medio del consumo del complemento y precipitación con PEG, observándose 3 tipos de cambios de nivel de complejos inmunes, -- los cuales fueron asociados con el curso clínico de la enfermedad (25).

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA

El uso del tabaco en sus diversas formas ha sido asociado con una importante morbilidad y mortalidad (26). Sus efectos adversos los han atribuido grandemente a la miríada de compuestos nocivos contenidos en el tabaco y su humo (27) (Cuadro 1).

Los compuestos de la combustión del tabaco han sido reunidos en 4 grandes grupos: gases, alquitranes, alcaloides y cenizas (28).

Entre los gases que se producen están:

- 1) Monóxido de carbono: este se incorpora a la sangre y se combina rápidamente con la hemoglobina formando la carboxihemoglobina, compuesto muy estable y que en las personas fumadoras aumenta hasta en un 20% ó más. Al aumentar la cantidad de carboxihemoglobina se disminuye el transporte de oxígeno y por consiguiente baja la oxigenación en todo el organismo. Además, aumenta la permeabilidad capilar favoreciendo la arteriosclerosis y la hipertensión.
- 2) Óxido nítrico: produce efectos tóxicos sobre la mucosa pulmonar, la que se paraliza, destruye los cilios del árbol respiratorio y altera la eliminación del moco favoreciendo la obstrucción del árbol bronquial.
- 3) Ácido cianhídrico: es un veneno altamente tóxico.

No hay duda de que existen en el tabaco sustancias carcinogénicas derivadas del alquitrán, las cuales se acumulan en todo el tracto respiratorio, se absorben, se metabolizan y se produce una irritación constante sobre los epitelios, lo cual predispone a la aparición de procesos degenerativos.

Respecto a los alcaloides, hay varios que se producen por la combustión del tabaco, pero el más conocido es la nicotina, que parece ser el compuesto que causa la adicción al tabaco, además, la nicotina produce, entre otras muchas cosas, vasoconstricción con el aumento de gasto cardíaco, lo que aunado a la

disminución de oxígeno por la producción del monóxido de carbono son los factores responsables de los accidentes por enfermedad coronaria obstructiva del corazón.

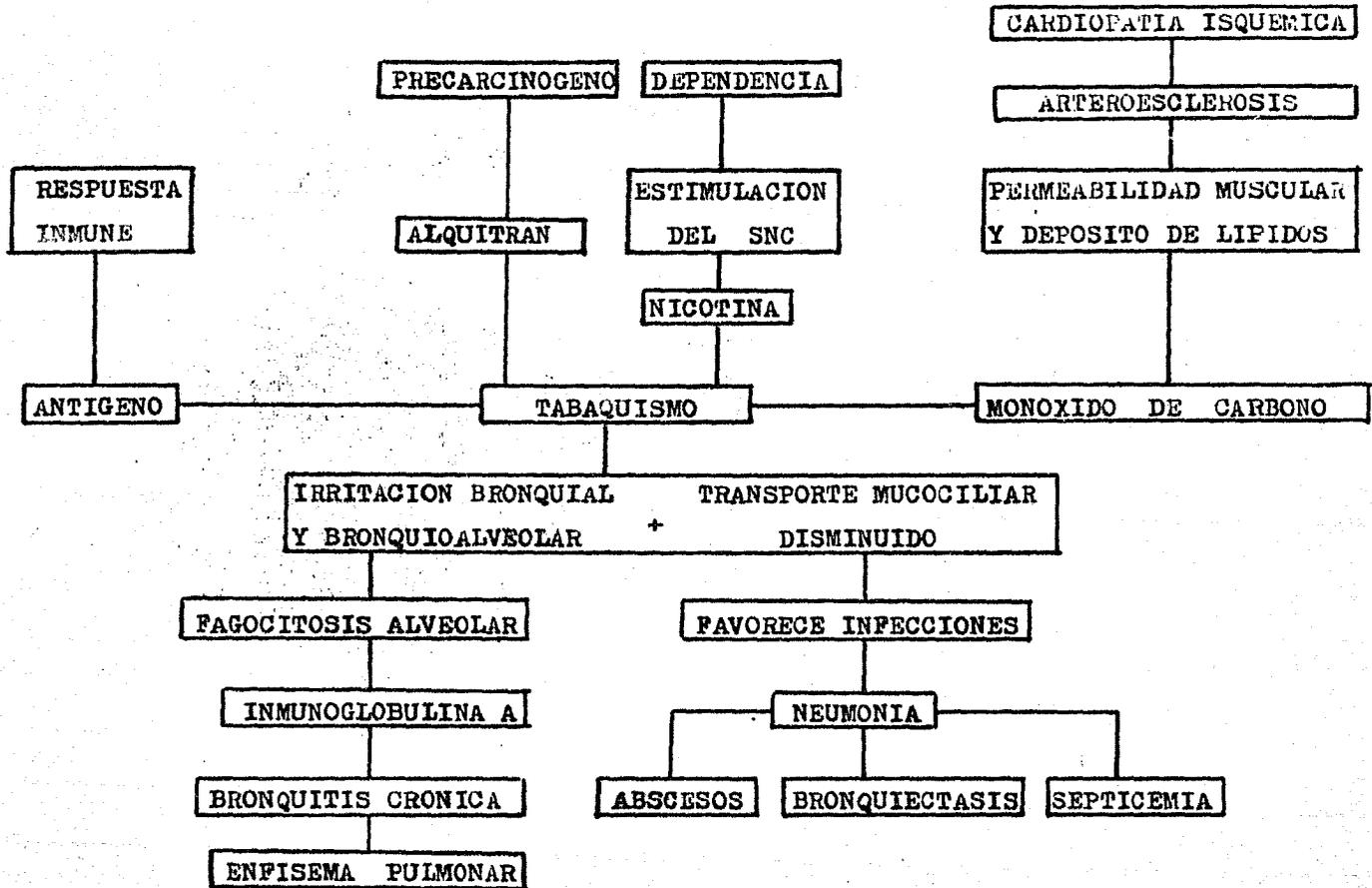
Las cenizas del tabaco son consideradas como las que menos dañan a la salud.

Los compuestos contenidos en el tabaco y en el humo del tabaco causan daño directo al organismo, ya que es muy estrecha la asociación del tabaquismo con las enfermedades pulmonares como el enfisema, la predisposición a bronquitis de repetición y al cáncer pulmonar (29,30).

Se considera que el tabaquismo es un factor de riesgo en el desarrollo de insuficiencia coronaria y en el infarto del miocardio.

El interés que ha resurgido sobre la asociación entre el tabaco y la respuesta inmune antitabaco ha motivado la elaboración de este trabajo, por lo cual se eligió como tema de tesis, para tratar de demostrar la presencia de complejos inmunes tabaco-antitabaco circulantes que pueden ser en parte, los responsables de algunos trastornos cardiovasculares observados con frecuencia en los individuos fumadores y con infarto del miocardio.

Cuadro 1. Alteraciones más frecuentes ligadas al tabaquismo (28).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que el tabaco contiene compuestos capaces de inducir una respuesta inmune humoral; se plantea la posibilidad de que se formen complejos inmunes con los antígenos del tabaco y que estos sean responsables de los trastornos cardiovasculares observados en personas fumadoras, por lo que se quiere demostrar y evaluar la presencia de complejos inmunes en el suero de pacientes fumadoras con y sin infarto del miocardio, así como demostrar los antígenos del tabaco y de los anticuerpos correspondientes que forman los complejos inmunes patogénicos.

OBJETIVOS

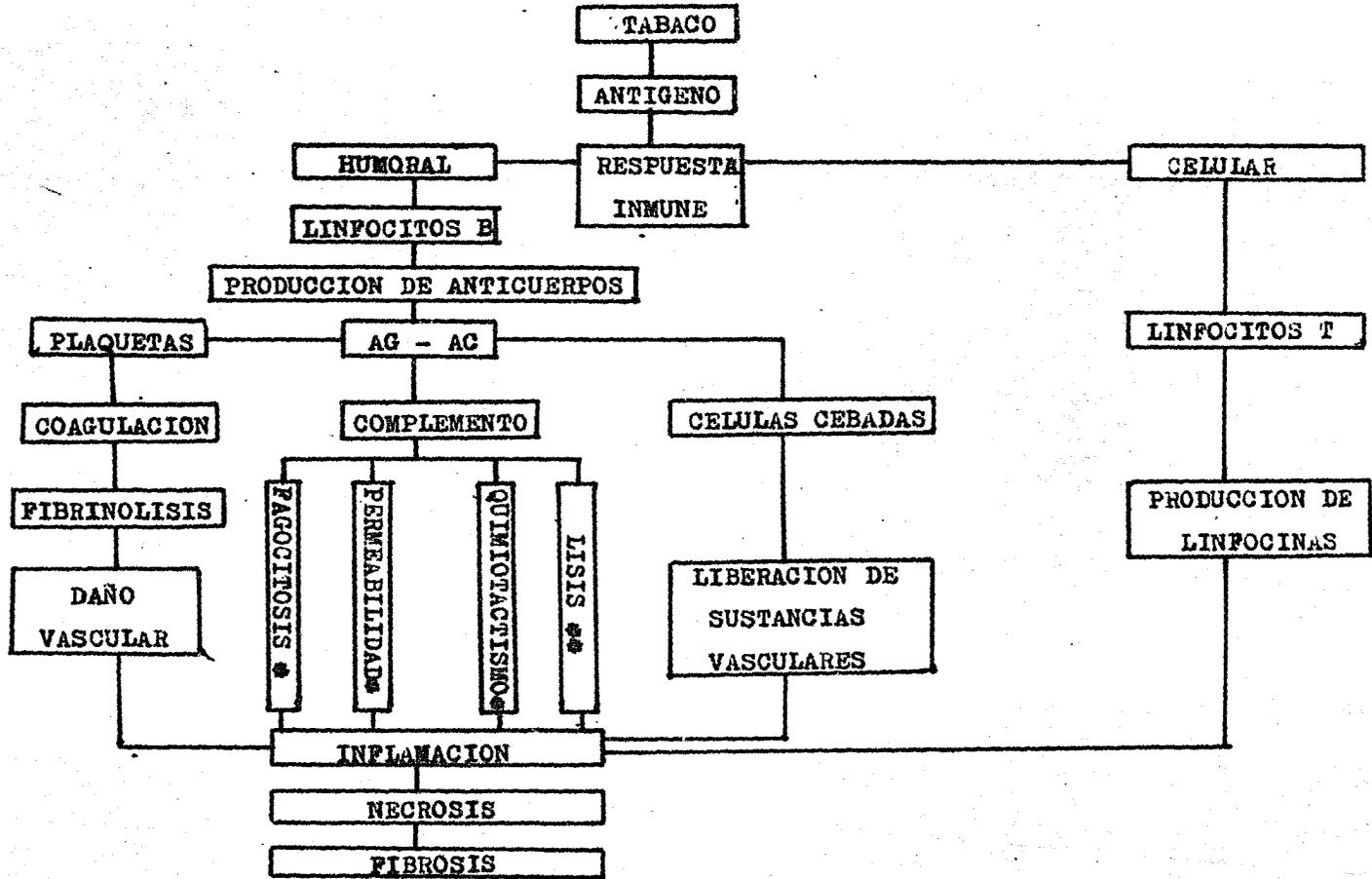
- 1) Demostrar "in vitro" el efecto de los complejos inmunes macromoleculares sobre fagocitos mononucleares, usando anticuerpos antitabaco producidos experimentalmente en conejos, mezclados con diversos extractos de tabaco con PBS, SDS, TW 20 y TR-X-100.
- 2) Determinar la presencia de complejos inmunes en los sueros de pacientes con IAM y demostrar que estos complejos contienen sustancias provenientes del tabaco.
- 3) Realizar un análisis comparativo de la presencia o ausencia, de los complejos inmunes tabaco-antitabaco en personas sanas, fumadoras y no fumadoras y con IAM.

HIPOTESIS

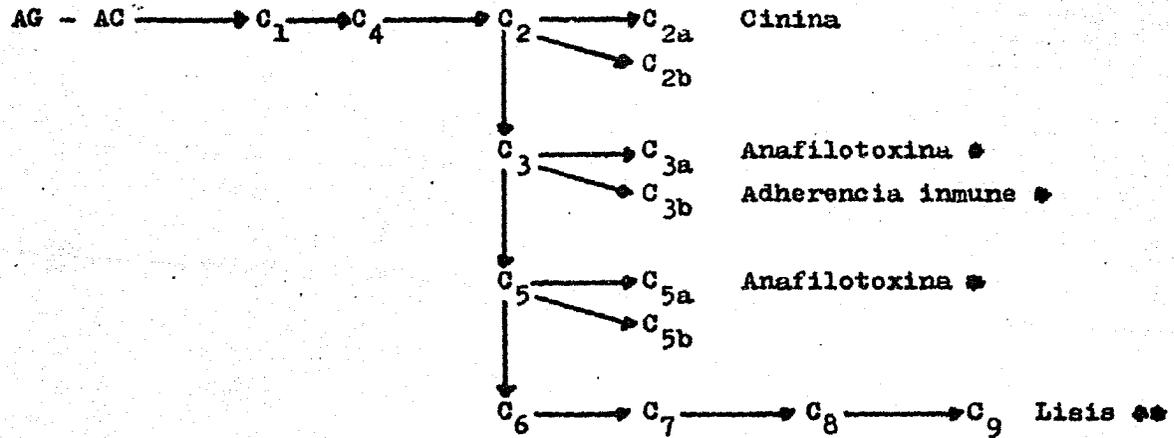
- 1) Si los complejos inmunes tabaco-antitabaco solo se encuentran en pacientes con IAM que tengan antecedentes tabáquicos y no en los sujetos fumadores sanos se podrá postular la patogenicidad de estos complejos inmunes.

- 2) Si los individuos fumadores tienen anticuerpos antitabaco de clase IgG y/o IgE, una nueva exposición frente al antígeno o alérgeno del tabaco inducirá la formación de complejos inmunes tabaco-antitabaco, los cuales pueden ocasionar daño, fundamentalmente en los vasos sanguíneos y este puede ser por cualesquiera de los mecanismos siguientes:
 - a) Activar las plaquetas llevándolas a la coagulación, posteriormente a fibrinólisis y finalmente al daño vascular. (Cuadro 2).
 - b) Fijar complemento, proceso que incrementa la inflamación y que da lugar a daño vascular (Cuadros 2 y 3).
 - c) Sensibilizar células cebadas, liberando sustancias vasoactivas que participan en la inflamación y en el daño vascular (Cuadro 2).

Cuadro 2. El tabaquismo y su relación con la respuesta inmune.



Quadro 3. Activación del complemento por la vía clásica.



METODOS DE TRABAJO

INMUNIZACION Y SANGRADO (31)

Se inyectó extracto salino de tabaco a conejos de 2.5 Kg. - de peso, en las siguientes fechas y condiciones:

Día

- 1 2 ml del extracto + 1 ml de adyuvante completo de Freud
- 8 2 ml de extracto
- 15 2 ml del extracto + 1 ml de adyuvante incompleto de Freud.

Estas 3 primeras inyecciones fueron por vía subcutánea y en varios sitios del costado de los conejos.

- 22 2 ml del extracto, vía intraperitoneal.
- 30 Sangrado de conejos

Se obtuvieron los antisueros contra el extracto y se congelaron a -20°C hasta el momento de usarlos.

- 60 2 ml del extracto, vía intraperitoneal.
- 68 Sangrado de conejos
- 90 2 ml del extracto, vía intraperitoneal.
- 98 Sangrado de conejos.

OBTENCION DEL EXTRACTO SALINO DE TABACO (31, 32)

- 1) Se pulverizó el contenido de una ó más cajetillas de cigarrillos (Delicados, Tabacalera Mexicana).
- 2) Se pesaron 18 g de tabaco y extrajeron los compuestos en un volumen de 450 ml de PBS 0.15 M, pH 7.2, quedando finalmente al 4% (p/v).
- 3) Se dejó a 4°C y con agitación continua por 18 hrs.
- 4) Se filtró la mezcla a través de una gasa y después con papel whatman No. 1 en un embudo.
- 5) Se repitió la operación por 2 veces.
- 6) Se centrifugó el filtrado resultante a 38 000 x g a 4°C por 30 min.
- 7) Para las extracciones del tabaco con detergentes se añadieron al PBS, TR-X-100 al 0.1%, ó TA-20 al 0.5% ó SDS al 5%.
- 8) Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (33) a todos los extractos.
- 9) Se etiquetaron y se congelaron a -20°C hasta el momento de su uso.

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY (33).

- 1) Se realizó una curva patrón con ASB a las concentraciones - de 110, 55, 37.5, 13.7 y 6.8 ug/0.1 ml.
- 2) Las muestras problema se diluyeron 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 con SSB 0.15 M pH 8.4.
- 3) Se tomó 0.1 ml de las diferentes diluciones de ASB y de las muestras problema, esto fue por duplicado. Como blanco se usó SSB.
- 4) Se añadieron 2 ml de solución A (+), se mezclaron y dejaron reposar por 10 min.
- 5) Se agregaron 0.2 ml de la solución B (++), se mezcló bien y se dejaron reposar las mezclas a una temperatura de 20°C por 30 min.
- 6) Se leyó la densidad óptica en un fotocolorímetro a 750 nm y en la región infrarrojo.

Soluciones empleadas:

Solución A (+)

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

Solución B (++)

Reactivo de fenol	1 ml
Agua destilada	1 ml

PRECIPITACION DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO (38)

- 1) Se tomaron alícuotas de 20 ml de extracto salino de tabaco y se les añadieron 15 g de sulfato de amonio, quedando a una concentración final del 75%.
- 2) Se agitó continuamente por 2 hrs. a 20°C. Después se mantuvo a 4°C durante 18 hrs.
- 3) Se centrifugaron las alícuotas a 11 000 x g a 5°C por 15 min. para recuperar las proteínas precipitadas.
- 4) Se resuspendió el botón en 5 ml de agua destilada y se dializó exhaustivamente durante 3 días en SSB utilizando una membrana que retuviera moléculas mayores de 12 000 de peso molecular.
- 5) Se comprobó la completa eliminación del sulfato de amonio con cloruro de bario al 10% en ácido clorhídrico al 0.5 N.
- 6) Se determinó la concentración proteica de cada uno de los precipitados y se guardaron a - 20°C hasta el momento de usarlos.

FIJACION DE ERITROCITOS CON GLUTARALDEHIDO (34)

- 1) Se lavaron los eritrocitos 3 veces con PBS 0.15 M pH 7.3
- 2) A 0.25 ul del botón de eritrocitos se le añadió 16 ml de - PBS y 0.5 ml de glutaraldehido al 2% en PBS y se agitó durante 60 min a 20°C.
- 3) Se centrifugaron y lavaron por 2 veces con PBS 0.15 M pH7.3
- 4) Se añadieron 10 ml de glicilglicina a 0.35% con PBS 0.15 M pH 7.3 y se agitó durante 60 min. a 20°C.
- 5) Se guardaron en el cuarto frío (4°C) por 18 hrs.
- 6) Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de eritrocitos en 25 ml de GVB, quedando así listos para usarlos.

Nota: En todos los experimentos se usaron eritrocitos del grupo A Rh positivo.

MICROHEMAGLUTINACION (35,36)

- 1) Se colocaron 25 ul de GVB en cada uno de los pocitos de la placa en "V" para hemaglutinación, menos en la primera fila.
- 2) En los primeros pozos se pusieron 50 ul de cada extracto, - menos en el control y se hicieron las diluciones correspondientes.
- 3) Se procedió a colocar en todos los pocitos 25 ul de eritrocitos glutaraldehizados al 1% y se cubrió la placa con papel celofán.
- 4) Se incubó durante 1 hr. a 37°C con agitación constante.
- 5) Las placas se llevaron al cuarto frío (4°C) y a las 24 hrs. se leyó el título de aglutinación.

MICRODOBLEINMUNODIFUSION (36,37)

- 1) Se disolvió agar al 1.5% en SSB 0.15 M pH 8.4 y azida de so dio al 0.1% en un baño de agua a 92°C.
- 2) Se depositó el agar en portaobjetos con moldes de lucita y se dejó gelificar durante 30 min. a 20°C
- 3) Se guardaron las placas a 4°C en cámara húmeda por 18 hrs.
- 4) Se colocaron 50 ul de la muestra problema (antígeno) y del - antisuero, en el pozo central de cada molde y en los pozos periféricos respectivamente.
- 5) Se permitió la difusión durante 3 días a 20°C en una cámara húmeda.
- 6) Se retiraron los moldes y se lavaron las placas en SSB 0.15 M pH 8.4 durante 5 días a 4°C, realizando 2 cambios. Al sex to día se lavaron en agua destilada por 2 hrs.
- 7) Se tiñeron las placas con azul brillante de coomassie durante 15 min. y se contrastaron con la solución decolorante.
- 8) Se registraron las bandas de precipitación obtenidas.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (35)

- 1) Se disolvió agarosa al 0.6% en solución reguladora para CIEF v/v con agua desionizada, agregando 0.1% de azida de sodio, en un baño de agua a 92°C.
- 2) Se colocaron 3 ml de agarosa fundida por laminilla, dejando gelificar durante 30 min. a 20°C.
- 3) Se guardaron las placas en cámara húmeda a 4°C por 18 hrs.
- 4) Se hicieron 6 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 problema. Se utilizó azul de bromofenol-ASB como indicador.
- 6) Se pasó una corriente de 2.5 mA por cada laminilla en la cámara de electroforesis hasta que el indicador recorrió 2.5 cm.
- 7) Se incubó 3 días a 20°C en cámara húmeda.
- 8) Se lavaron las placas en SSB 0.15 M pH 8.4 durante 5 días a 4°C realizando 2 cambios de esta solución, posteriormente se dejaron 2 hrs. en agua destilada.
- 9) Se cubrieron las placas con papel filtro y se metieron en - una estufa a 37°C hasta que secaron.
- 10) Se tiñeron con azul brillante de coomassie durante el tiempo necesario y se contrastaron con la solución decolorante.
- 11) Se registró el número de bandas de precipitación obtenidas.

CALIBRACION PARA PESO MOLECULAR DE UNA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

- 1) Se pesaron 2 mg de dextran azul 2000 (peso molecular 2×10^6) y se disolvió en 0.5 ml de SSB 0.15 M pH 8.4 a 57°C con agitación.
- 2) Se añadieron 2 mg de citocromo C (peso molecular 12 348) y se disolvió a 20°C con agitación.
- 3) Se agregaron 2 mg de ASB (peso molecular 66 500) y se disolvió a 20°C .
- 4) Esta mezcla se pasó por una columna de Sephacryl S-200, e -
quilibrada con SSB.
- 5) Se colectaron las fracciones y se leyeron en un espectrofotómetro a 415 nm, 620 nm y 750 nm, las 2 primeras longitu -
des de onda el espectro en visible y la última en infrarrojo.
- 6) Se les determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col.

PRECIPITACION CAPILAR (2)

- 1) Se marcaron capilares a distancias iguales.
- 2) Se introdujo el antisuero por capilaridad hasta la primera marca.
- 3) De la misma manera se introdujo el extracto de tabaco hasta la segunda marca.
- 4) Se selló el capilar con plastilina.
- 5) Se hizo lo mismo con diferentes diluciones del extracto.
- 6) Se incubaron a 37°C por 72 hrs.
- 7) Se midió el precipitado formado en el tubo capilar.

FORMACION DE COMPLEJOS INMUNES " IN VITRO "

- 1) Se mezclaron 0.5 ml del extracto de tabaco con 1 ml de antisuero y se incubaron a 37°C por 30 min.
- 2) Se centrifugó a 550 x g por 5 min. con el objeto de eliminar los complejos inmunes macromoleculares.
- 3) Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante el cual contenía los complejos inmunes solubles y se pasó por una columna de Sepha-cryl-S200, equilibrada con SSB.
- 4) Las fracciones obtenidas se estudiaron por CIEP, MDID, microhemaglutinación y se les determinó la concentración de pro-teínas por el método de Lawry y col.

OPTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES (42)

- 1) Se sacrificaron perros a los que posteriormente se les dise_ có la tráquea y se les introdujo un cateter.
- 2) Los macrófagos alveolares se obtuvieron mediante varios la- vados traqueobronqueales con 60 a 100 ml de PBS 0.15 M pH 7.4 conteniendo estreptomycin (20 ug/ml).
- 3) Las células se mantuvieron entre 2 a 4°C durante todo el - procedimiento.
- 4) Se lavaron 3 veces con PBS y se centrifugaron a 550 X g du- rante 10 min. a 4°C, desechando el sobrenadante en cada ca- so.
- 5) Los macrófagos se glutaraldehizaron.

GLUTARALDEHIZACION DE MACROFAGOS ALVEOLARES (34)

- 1) A un paquete de 0.25 ml conteniendo aproximadamente 200×10^6 macrófagos lavados con PBS se les agregaron 16 ml de PBS y 0.5 ml de glutaraldehído al 2% en PBS y se agitaron durante 60 min. a 4°C .
- 2) Se centrifugaron a 550 x g por 10 min. a 4°C .
- 3) Se lavaron 2 veces con PBS.
- 4) Se les añadieron 10 ml de glicilglicina al 0.35% en PBS y se agitaron durante 60 min. a 4°C .
- 5) Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células hasta tener una concentración final de 20×10^6 células por ml. en medio TC-199 y gelatina (1 mg/ml).
- 6) Se contaron las células en una cámara de Neubauer.

CUENTA DE MACROFAGOS ALVEOLARES

- 1) Se homogenizó la suspensión de macrófagos y se lleno una pipeta para cuenta de glóbulos blancos hasta la marca de 0.5
- 2) Se aforó la pipeta hasta la marca de 11 con PBS.
- 3) Se agitó por 3 min.
- 4) Se desecharon las 3 primeras gotas y la cuarta gota se puso en una cámara de Neubauer.
- 5) Se observó al microscopio y se contaron las células presentes en los cuatro cuadrantes de los extremos.
- 6) Se multiplicó el número de células contadas por un factor - de 50 para obtener el número total de células por ml.

PRECIPITACION DE COMPLEJOS INMUNES CON PEG 6 000 (39).

- 1) Se añadieron 500 ul de la muestra en que se sospechó la existencia de complejos inmunes más 1 500 ul de una solución reguladora de EDTA y 10 ml de PEG al 6%.
- 2) Se incubó la mezcla a 4°C por 18 hrs.
- 3) Se centrifugó a 1 000 x g por 20 min.
- 4) Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 10 ml de PEG al 5%, recentrifugándose.
- 5) Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 200 ul de PBS-AZ.
- 6) Se dejó 20 min. a 20°C con agitación constante para disolver el precipitado.
- 7) Se etiquetaron y congelaron a -20°C hasta su uso.

FIJACION DE COMPLEJOS INMUNES A MACROFAGOS ALVEOLARES

- 1) Se tomaron 100 ul de la solución que contenía los complejos inmunes precipitados con PEG 6 000 y se incubaron a 37°C - por 2 hrs. con 100 ul de macrófagos alveolares de perro (2×10^6 células).
- 2) Se añadieron 900 ul de PBS-AZ.
- 3) Se centrifugaron a 1 000 X g por 10 min.
- 4) Se determinó en el sobrenadante la presencia del antígeno y anticuerpo antitabaco por CIEF, microhemaglutinación y se midió la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (33).
- 5) Se lavó el botón celular resuspendiendolo en 900 ul de PBS-AZ y se centrifugó a 1 000 X g por 10 min.
- 6) Se desechó el sobrenadante y el botón resultante se procesó por las técnicas de electroforesis en gel de PAA-SDS y/o inmunofluorescencia.

INMUNOFLUORESCENCIA (39, 40, 41)

- 1) Al botón celular de macrófagos con los complejos inmunes se les añadieron 100 ul de anticuerpos contra gammaglobulina humana fluoresceinados, diluidos 1:5 con PBS.
- 2) Se incubaron a 37°C por 30 min.
- 3) Se lavaron 3 veces con PBS-AZ desechando el sobrenadante en cada caso.
- 4) Se resuspendieron en 100 ul de PBS-AZ.
- 5) Se colocaron los macrófagos en un portaobjetos, se les agregó una gota de glicerina-PBS y les puso un cubreobjetos.
- 6) Se observaron en un microscopio de epifluorescencia con lám para de mercurio OSRAM HBO 200 W, y un filtro de barrido - BG 12/3, así como filtros de absorción de 500 y 440 nm. La presencia de anticuerpo y/o antígeno del tabaco en la superficie de los macrófagos se evidenció por inmunofluorescencia
- 7) Se contaron 100 células indicándose el porcentaje de células positivas.
- 8) Se utilizaron los controles correspondientes para cada inmunoreactante y de macrófagos que no recibieron ningún tratamiento.

DISOCIACION DE COMPLEJOS INMUNES

- 1) Al botón de macrófagos alveolares que tenían fijados los - complejos inmunes se les añadieron 300 ul de SDS al 1% para disociar dichos complejos inmunes de la membrana de los macrófagos.
- 2) Se incubaron a 37°C por 30 min.
- 3) Se procesaron los eluidos por electroforesis en gel de PAA-SDS para identificar los anticuerpos y los antígenos de tabaco provenientes de los complejos inmunes.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (39,43)

A) Preparación de los geles:

- 1) Se prepararon geles de 8 cm de largo y 0.5 cm de diámetro con las siguientes soluciones:

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

- 2) Se mezclaron en este orden con agitación constante.
- 3) Se depositó la mezcla con una pipeta pasteur en tubos de vidrio hasta la marca de 8 cm.
- 4) Se adicionó agua hasta el borde de los tubos para evitar la desecación del gel y para que la polimerización fuera homogénea.
- 5) Se mantuvieron a 20°C hasta el momento de usarlos.

B) Preparación de la muestra:

- 1) Se calentaron 10 ul de la solución A (+) con 90 ul de la muestra problema, en un baño maría a 60°C durante 15 min.
- 2) Se enfriaron a 20°C y se les agregó 70 ul de solución B (++) .

Solución A (+)

Solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 7	80 ml
SDS al 10%	10 ml
B-mercaptoetanol	10 ml

Solución B (++)

Solución reguladora de fosfatos

0.2 M con 0.2% de SDS	5.0 ml
B- Mercaptoetanol	0.5 ml
Azul de bromofenol	2.0 mg
Glicerina	5.0 ml

C) Electroforesis:

- 1) Se eliminó el agua de la parte superior de los tubos y se les colocaron 50 ul de cada una de las muestras problema y de un control de proteínas con peso molecular conocido.
- 2) Se acomodaron los tubos en la cámara para electroforesis.
- 3) Se adicionó PBS 0.1 M pH 7 con ayuda de una pipeta pasteur a cada tubo y posteriormente a la cámara.
- 4) Se pasó una corriente con 4 mA por cada tubo hasta que la muestra pasó la interfase.
- 5) Se incrementó la intensidad de la corriente hasta dar 8 mA por tubo.
- 6) Al finalizar la electroforesis se sacaron los geles de los tubos y se midió el frente del colorante.
- 7) Se metieron los geles en una solución fijadora por 24 hrs
- 8) Se sacaron y se tiñeron con azul brillante de coomassie durante 40 min.
- 9) Se contrastaron con una solución decolorante.
- 10) Se registró el número de bandas obtenidas.
- 11) Se determinó su Rf mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia de migración de la proteína desde el origen}}{\text{distancia desde el origen al punto de referencia}}$$

MATERIAL BIOLÓGICO

ANIMALES EXPERIMENTALES:

- 1) Conejos de Nueva Zelanda de 2 a 2.5 Kg de peso, ambos sexos, a los cuales se les identificó con las letras A y B
- 2) Perros de 12 a 15 Kg de peso, ambos sexos obtenidos del biot_{er}io del INC.

GRUPOS DE INDIVIDUOS:

- 1) Los sueros de pacientes con IAM se obtuvieron del laboratorio de Urgencias del INC. El diagnóstico de IAM se estableció de acuerdo a parámetros clínicos, electrocardiográficos y de laboratorio (45).
- 2) Los sueros de sujetos sanos desde el punto de vista clínico y aplicando las pruebas rutinarias se obtuvieron de donadores del banco de sangre del INC.

Los 2 grupos de sujetos estudiados se dividieron en 2 sub - grupos:

- a) Fumadores
- b) No fumadores

PREPARACION DE SOLUCIONES

SOLUCION SALINA BORATO (SSB) 0.15 M pH 8.4

a) Solución reguladora de borato

Acido borico	6.18 g
Borato de sodio	9.53 g
Cloruro de sodio	4.38 g
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml

Ajustar el pH a 8.4 con HCl ó NaOH

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

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 con el metanol y agitar durante - 24 hrs. a 20°C enfrasco ámbar.

Filtrarlo y adicionarle el ácido acético y el agua.

Guardarlo en frasco ámbar a 20°C.

SOLUCION DECOLORANTE

Acido acético glacial	50 ml
Metanol	50 ml
Glicerol	10 ml
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml

SOLUCION REGULADORA DE EDTA 0.2 M pH 7.5

EDTA disódico	76.0 g
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1 N.

SOLUCION REGULADORA SALINA BORATO (SSB) pH 8.3 PARA PRECIPITACION DE COMPLEJOS INMUNES.

Acido bórico 0.1 M

Tetraborato de sodio 0.25 M

Cloruro de sodio 0.75 M

Mezclar las 3 soluciones y ajustar el pH con NaOH ó HCl.

POLIETILENGLICOL 6 000 AL 5% p/v (PEG 6 000)

Polietilenglicol 6 000 50 g

SSB pH 8.3 para precipitación de complejos inmunes 1 000 ml

SOLUCION REGULADORA DE GELATINA-VERONAL (GVB) pH 7.4

Solución I

Cloruro de sodio 85 .0 g

Diethyl barbiturato de sodio 3.25 g

Agua destilada 1 400 ml

Solución II

Acido dietilbarbitúrico 5.72 g

Agua destilada 500 ml

- 1) Mezclar la solución I y II y dejar enfriar.
- 2) Agregar 2 g de gelatina para la solución final 0.1%
- 3) Aforar a 2 litros con agua destilada y guardar en el refrigerador. Para su uso diluir 1:5 con agua destilada.

SOLUCION FIJADORA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA.

Acido tricloroacético 57.0 g

Acido sulfosalicílico 17.0 g

Metanol 150 ml

Agua destilada 350 ml

SOLUCION REGULADORA SALINA FOSFATO (FBS) 0.15 M, pH 7.4

Cloruro de sodio 0.15 M

Fosfato de sodio dibásico 0.15 M

Fosfato de sodio monobásico 0.15 M

Mezclar la solución de cloruro de sodio con la de fosfato - de sodio dibásico y ajustar el pH a 7.4 con la solución de fosfato de sodio monobásico.

SOLUCION REGULADORA PARA CIEF pH 8.6

Barbital de sodio 9.0 g

Azida de sodio 1.0 g

Acido clorhídrico 1 N 6.5 ml

Agua desionizada c.s.p. 1 000 ml

Mezclar todo y ajustar el pH a 8.6 con NaOH 1 N.

SOLUCION REGULADORA SALINA FOSFATO CON AZIDA DE SODIO (PBS-AZ) pH 7.2 PARA COMPLEJOS INMUNES.

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 ajustarle el pH a 7.2 con la solución de fosfato de sodio monobásico. Posteriormente añadirle la azi da de sodio.

SOLUCION DECOLORANTE PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Metanol 5%

Acido acético 5%

Agua destilada c.s.p. 1 000 ml

RESULTADOS

PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LOS EXTRACTOS DE TABACO.

Los extractos de tabaco denotados con el subíndice 1 se refieren a los extractos salinos que fueron obtenidos tal como - esta especificado en material y métodos. El extracto con PBS y el de SDS tuvieron una concentración proteica de 2.5 mg/ml; los extractos con TW-20 y TR-X-100 fueron de 1.9 y 4.4 mg/ml respectivamente (Tabla I-A).

Los extractos de tabaco denotados con el subíndice 2 fueron sometidos a una precipitación con sulfato de amonio, para el aislamiento de las proteínas del tabaco. La concentración de éstas fue inferior a la encontrada en los extractos señalados con el subíndice 1 (Tablas I-A y I-B). El extracto con PBS y el de TR-X-100 tuvieron 0.37 y 0.35 mg/ml respectivamente; con SDS y TW-20 se tuvieron concentraciones de 0.17 y 0.19 mg/ml respectivamente.

Un tercer extracto con PBS (TPBS₃) en el que se usó tabaco al 14.8% (p/v) se tuvo 11.5 mg/ml de proteína (Tabla I-A).

Los 3 grupos de extractos que se probaron por aglutinación dieron títulos de 1:2. Por CIEF se les enfrentó contra los anticuerpos antitabaco obtenidos en conejos inmunizados con extractos salinos y se observaron hasta 4 bandas de precipitación (Tablas I-A y I-B).

La electroforesis en geles de PAA-SDS de los extractos con PBS₃ y TR-X-100₁, mostraron bandas con pesos moleculares de 1.55×10^4 a 6.8×10^4 daltones (Tabla I-C y Figuras 1 y 2). El patrón usado como referencia fue desde 1.44×10^4 hasta 9.4×10^4 daltones (Figuras 1 y 2).

PROPIEDADES DE LOS ANTISUEROS ANTITABACO

Se utilizaron antisueros de 2 conejos (denotados como A y B),

ambos inmunizados con el extracto conteniendo PBS (31). Estos antisueros tuvieron una concentración proteica de 81 y 71 mg/ml respectivamente. Los títulos de aglutinación con eritrocitos humanos (A Rh positivo) fueron desde 1:2 para el conejo A, hasta 1:64 para el conejo B.

Al enfrentar los 2 antisueros contra antígenos del extracto de tabaco por CIEF se registraron de 1 a 4 bandas de precipitación. Los resultados se muestran en la tabla II.

PRUEBAS INMUNOSEROLOGICAS DE LOS COMPLEJOS INMUNES FORMADOS "IN VITRO" ENTRE ANTIGENOS DE TABACO Y ANTISUEROS ANTITABACO

Los extractos denotados con el subíndice 1,2 y 3 tuvieron las características señaladas en las tablas I-A, I-B y I-C y de los antisueros en la tabla II.

La mezcla de los antisueros y los extractos mostraron actividad aglutinante y además un ligero exceso de anticuerpos en la CIEF; así mismo no fue posible demostrar la presencia de antígenos libres en las mezclas de extracto de tabaco subíndice 1 con antisuero y en los extractos con SDS₂ y TR-X-100₂, a excepción de TPBS₂ y TTW-20₂ con antisuero en que sí se pudo demostrar la existencia de antígenos libres (Tabla III, CIEF y MDID).

La precipitación capilar fue positiva hasta la dilución 1:4. Los complejos inmunes pasados por electroforesis en gel de PAA SDS presentaron 1 banda de peso molecular comprendido entre 4.2×10^4 a 6.0×10^4 daltones (Tabla III).

ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO EN
EL SOBRENADANTE DE COMPLEJOS INMUNES FIJADOS A MACROFAGOS
ALVEOLARES

Los complejos inmunes formados "in vitro" (anticuerpos anti tabaco con antígenos del tabaco) fueron incubados con macrófagos alveolares, para que se fijaran a su membrana y de esta manera lograr su aislamiento.

En el sobrenadante de esta incubación no se encontraron por CIEF ni antígenos, ni anticuerpos libres. La hemaglutinación - fue negativa en todas las mezclas de tabaco y antisuero anti tabaco. La concentración de proteína fue desde 0.03 hasta 0.19 mg/ml con un promedio de 0.1 mg/ml (Tabla IV).

Los controles del estudio con extractos y antisueños con - SSB fueron negativos para hemaglutinación y CIEF. La concentración proteica del extracto de tabaco con PBS₁ y SSB fue de 0.13 mg/ml, con SDS₁ y SSB de 0.17 mg/ml, con TW-20₁ y SSB de 0.07 mg/ml, con TR-x-100₁ y SSB de 0.1 mg/ml y para el antisuero del conejo A con SSB fue de 0.13 mg/ml.

EXTRACTOS SALINOS DE TABACO Y ANTISUEÑOS PROCESADOS POR CROMA-
TOGRAFIA EN SEPHACRYL S-200.

Los extractos salinos de tabaco que se denotan por el subíndice 1, así como el antisuero de conejo A, eluidos con SSB presentaron 1 pico (Figura 3) cuando se les determinó a cada una de las fracciones obtenidas la concentración proteica por el método de Lowry y col. (33). La cromatografía fue realizada en una columna de Sephacryl S-200 de 55 cm de altura y 1 cm de diámetro, bajo las siguientes condiciones de corrida: se usó SSB a 4 gotas/min. y 50 gotas/tubo (3.5 ml/tubo).

El suero del conejo A presentó un pico de aproximadamente -

1.35×10^6 daltones en la fracción No. 10 alcanzando hasta 1.4 mg/ml de proteína.

Solamente los extractos de tabaco con PBS_1 y SDS_1 presentaron un pico con un peso molecular menor a 12 348 daltones y su concentración máxima de proteína fué de 0.08 mg/ml en la fracción No. 16 para el extracto con PBS_1 y de 0.16 mg/ml de proteína en la fracción No. 15 para el extracto de tabaco con SDS_1 . Los extractos salinos con $TW-20_1$ y $TR-X-100_1$ no tuvieron una concentración de proteína detectable por este método en ninguna de las fracciones.

Todas las fracciones obtenidas para cada uno de los diferentes extractos de tabaco y del antisuero de conejo no mostraron reactividad al enfrentarlos con los anticuerpos ó los antígenos correspondientes en las pruebas de CIEF y MDID. La hemaglutinación fue negativa para las fracciones de los diferentes extractos salinos de tabaco, excepto para el suero en las fracciones 8 y 9 en los que se obtuvo aglutinación.

Los diferentes extractos salinos de tabaco a los cuales se les trató con sulfato de amonio para precipitar las proteínas, logrando así aumentar su concentración proteica (subíndice 2), así como el antisuero de conejo B con SSB, fueron pasados por una columna de Sephacryl S-200 de 115 cm de altura por 1 cm de diámetro, equilibrada con SSB 0.15 M pH 8.3 y bajo las siguientes condiciones de corrida: 8 gotas/min. y 50 gotas/tubo que equivalen a 3.5 ml/tubo.

Los extractos salinos de tabaco conteniendo los diferentes detergentes no dieron lectura al determinarles la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (33).

En la figura 3 se muestra la presencia de un pico en la fracción No. 23 con un peso molecular de 1.23×10^6 daltones que -

corresponde al suero de conejo B.

Con el extracto de tabaco con PBS a una concentración de 11.5 mg/ml que se denotó con el subíndice 3, se registró un pico en la fracción No. 46 de peso molecular menor a 12 348 daltones y una concentración de 0.05 mg/ml de proteína (Figura 4).

Todas las fracciones obtenidas para cada uno de los diferentes extractos salinos de tabaco subíndices 2 y 3 fueron negativos al ser probados por CIEF y microhemaglutinación a excepción de la fracción No. 19 del antisuero que dió un título de aglutinación de 1:1.

En el perfil de un suero proveniente de un individuo con IAM se observaron 2 picos, uno en la fracción No. 27 con 0.78 mg/ml de proteína y un peso molecular de 6.23×10^5 daltones y el otro en la fracción No. 30 con 1.04 mg/ml de proteína y un peso molecular de 2.52×10^4 daltones (Figura 5). Las fracciones obtenidas de este suero probadas por CIEF y microhemaglutinación fueron negativas en ambos casos.

Los resultados de las pruebas realizadas con cada extracto salino subíndices 1,2,3 y de los antisueros de los conejos A y B se reportan en las tablas V y VI y estos corresponden a las preparaciones usadas en el análisis cromatográfico (Figuras 3, 4 y 5). Además, estos mismos extractos salinos de tabaco y antisueros de conejo, mezclados ambos con SSB, se les aplicó electroforesis en geles de PAA-SDS y los resultados fueron negativos para todos.

COMPLEJOS INMUNES FORMADOS "IN VITRO" CON ANTIGENOS DE TABACO
Y ANTISUERO ANTITABAGO PROCESADOS POR CROMATOGRAFIA EN SEPHA-
CRYL S-200.

Las mezclas de los diferentes extractos salinos de tabaco con antisuero de conejo A se obtuvieron de acuerdo a las especificaciones indicadas en el método (Tabla III) y presentaron 2 picos (Figura 6) cuando se les determinó a cada una de las fracciones obtenidas la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (33). La cromatografía fue realizada en una columna de Sephacryl S-200 de 55 cm de altura por 1 cm de diámetro, equilibrada con SSB y bajo las siguientes condiciones de corrida: 4 gotas/min. y 50 gotas /tubo.

El extracto de tabaco con PBS, SDS y TW-20 mezclados con el antisuero presentaron un pico en la fracción No. 10 con un peso molecular de 1.35×10^6 daltones. Su concentración de proteína para el extracto con PBS y antisuero es de 1.68 mg/ml, para el extracto con SDS y antisuero es de 1.22 mg/ml y de 1.30 mg por ml para el extracto con TW-20 y antisuero.(Figura 6).

Un segundo pico aparece en diferentes fracciones y en los 3 casos tienen un peso molecular menor a 12 348 daltones. En el extracto de tabaco con PBS y antisuero este segundo pico aparece en la fracción No.17 y tiene una concentración proteica de 0.38 mg/ml; en la fracción No.16 coinciden los picos del extracto con TW-20 y antisuero con una concentración de 0.30 mg/ml y de 0.18 mg/ml de proteína respectivamente.

El extracto con TR-X-100 y antisuero tiene un pico en la fracción No.11 con un peso molecular de 7.1×10^5 daltones y con una concentración de 1.36 mg/ml de proteína y otro en la fracción No.14 con 0.44 mg/ml de proteína y un peso molecular menor de 12 348 daltones (Figura 6).

Las fracciones obtenidas con estos 4 diferentes extractos y an tisueros fueron negativos al probarlos por CIEF y MDID. La microhemaglutinación fue negativa a excepción de las fracciones 16,17 y 18 del extracto de tabaco con PBS y antisuero, en los cuales se obtuvieron resultados positivos con títulos de 1:4 , 1:8 y 1:1 respectivamente.

En la figura 7 se muestran los perfiles obtenidos al pasar una mezcla de extracto de tabaco (subíndice 2) con antisuero - de conejo B (Tabla III). Se usó una columna de Sephacryl S-200 de 115 cm de altura por 1 cm de diámetro equilibrada con SSB - y bajo las siguientes condiciones de corrida: 8 gotas/min. y 50 gotas/tubo.

El extracto con SDS₂ y antisuero, el extracto con TW-20₂ y antisuero y el extracto con TR-X-100₂ y antisuero presentan 1 pico que coincide en la fracción No. 26 con un peso molecular de 7.76×10^5 daltones siendo su concentración de proteína de 0.86 mg/ml, 0.79 mg/ml y de 0.96 mg/ml respectivamente. En el caso del extracto con PBS₂ y antisuero, el pico se presenta en la fracción No. 25 con un peso molecular de 9.29×10^5 daltones y su concentración de proteína fue de 0.8 mg/ml.

La cromatografía de la mezcla de un suero humano con IAM y el extracto con PBS₃ (11.5 mg/ml de proteína), se notan 3 picos distinguibles en las fracciones No. 23,26 y 29 y con una - concentración proteica de 0.24 mg/ml, 0.49 mg/ml y 1.0 mg/ml y pesos moleculares de 1.23×10^6 , 7.76×10^5 y 3.18×10^5 dalto nes respectivamente (Figura 7).

Las fracciones de los difernetes extractos y antisueros fue ron negativos al probarlos por CIEF, siendo positivos por micro hemaglutinación, cuyos resultados se reportan en las tablas - VII.

ESTUDIO DE COMPLEJOS INMUNES EN EL SUERO DE PACIENTES CON IAM.

En el cuadro No. 4 se muestra un diagrama de flujo para el análisis de los sueros humanos en los que se sospechaba la existencia de complejos inmunes tabaco-antitabaco.

Del grupo de 49 sueros de pacientes con IAM, de los cuales 38 eran fumadores y 11 no fumadores, se probaron con CIEF. El 94.7% de los fumadores fueron positivos al enfrentarlos contra antígenos de tabaco y el 23.6% reaccionaron con el antisuero - antitabaco; en los no fumadores, un 100% reaccionó contra el - antígeno de tabaco y un 27.2% contra el antisuero (Tabla VIII y Figura 8).

Los sueros de estos sujetos fueron precipitados con PEG 6000; el botón resultante se incubó con los macrófagos alveolares -- (ver métodos de trabajo); se centrifugó y en el sobrenadante - no fue posible demostrar ni anticuerpos, ni antígenos libres - por CIEF. La concentración de proteína en el sobrenadante para ambos grupos fue en promedio de 0.16 mg/ml.

El precipitado del suero con PEG 6000 también se procesó por electroforesis en geles de PAA-SDS dando una positividad del - 93.7% en los fumadores y 90% en los no fumadores (Tabla IX y Figura 2).

Los complejos inmunes fijados a macrófagos alveolares fue - ron separados de la membrana de los macrófagos con SDS. Los e- luidos resultantes se sometieron a electroforesis en geles de PAA-SDS y los resultados fueron negativos, tanto para fumadores como para no fumadores.

A los macrófagos alveolares con complejos inmunes provenien tes de los sueros que fueron precipitados con PEG 6000 se les incubó con anticuerpos contra gammaglobulina humana fluorescei nados, para determinar la presencia de anticuerpos en la mem -

brana del macrófago. Ambos grupos de sueros, los provenientes de personas fumadoras y no fumadoras fueron positivos. En los 2 casos se registró un 100% de positividad, pero la diferencia fue de que en el grupo de los fumadores se presentó un promedio del 14% de células positivas y de 10% de células positivas en los no fumadores (Tabla X).

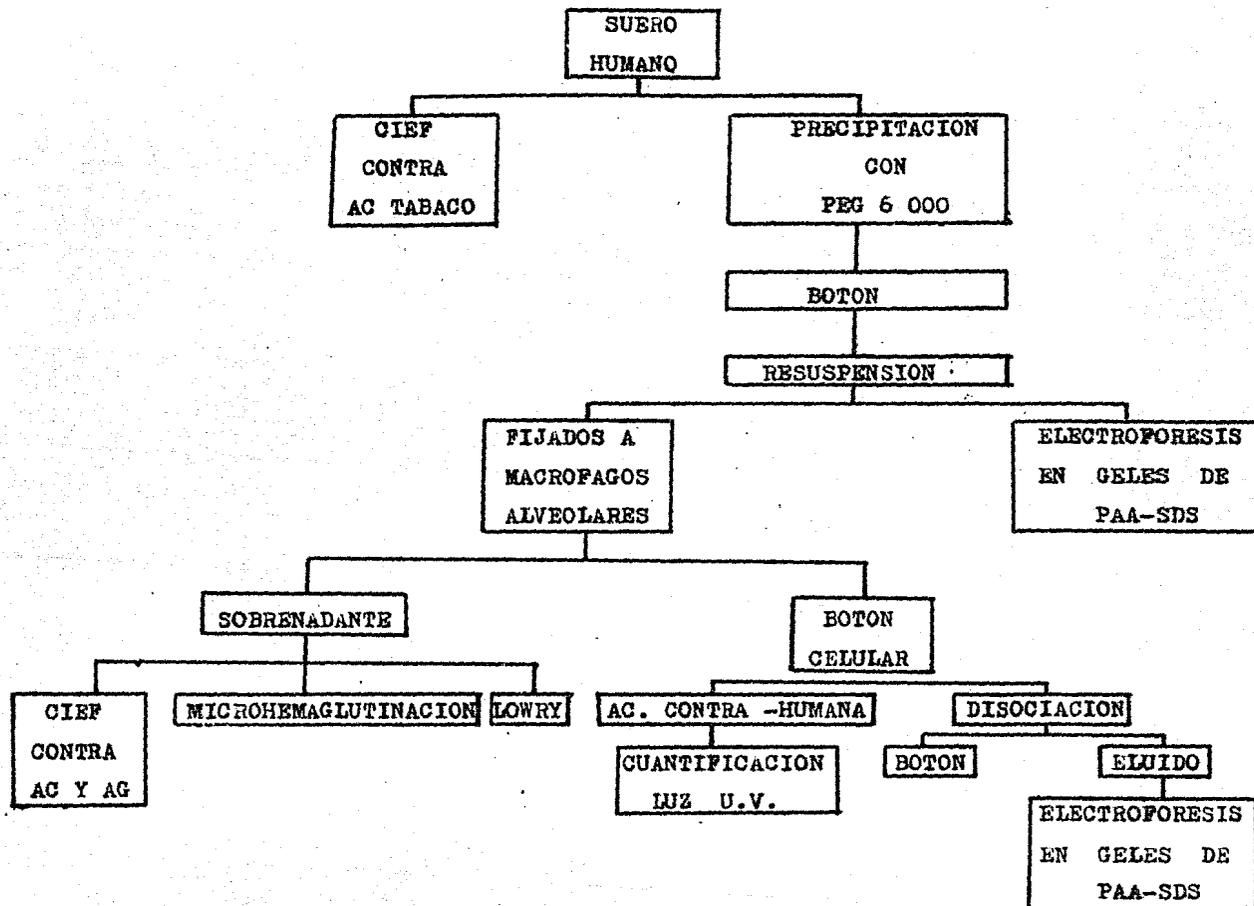
REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE INDIVIDUOS DONADORES DE SANGRE CONTRA ANTIGENOS DE TABACO.

Un grupo de 47 sueros de individuos donadores de sangre, -- clínicamente sanos y de ambos sexos, de los cuales 42 eran fumadores y 5 no fumadores se procesaron por CIEF, se les precipitó con PEG 6000 y por electroforesis en geles de PAA-SDS -- (Cuadro 4).

Los sueros de los donadores fumadores y no fumadores mostraron tener alta reactividad por CIEF contra extractos de tabaco, siendo mayor en la de los fumadores que fue del 92.8% con respecto a los no fumadores que fue del 80% con la diferencia de que en los fumadores se presentaron hasta 3 bandas de precipitación y en los no fumadores solamente hasta dos (Tabla XI).

Por electroforesis en geles de PAA-SDS se tuvo un 59.5% de positividad para los fumadores y de un 80% para los no fumadores con la diferencia de que en los primeros se registraron -- hasta 5 bandas y en los no fumadores hasta 3 bandas de proteína (Tabla XII y Figura 2).

Cuadro 4. Diagrama de flujo de trabajo para el estudio de los complejos inmunes en sujetos con IAM y donadores de sangre.



TABLAS

TABLA I-A

PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE TABACO

Extracto salino de tabaco	Concentración proteica (mg/ml) *	Título de aglutinación **	CIEF ***	MDID ***	Bandas en electroforesis de PAA-SDS
TPBS ₁	2.5 (376 ml)	1:2	2	1	0
TSDS ₁	2.5 (352 ml)	1:1	2	1	0
Ttw-20 ₁	1.9 (382 ml)	1:1	2	1	0
Ttr-x-100 ₁	4.4 (372 ml)	0	1	0	3
TPBS ₃	11.5 (250 ml)	0	2	-	4

* Volumen total dentro del paréntesis.

**Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo

***Se enfrentaron los extractos a los sueros antitabaco producidos en conejos -

(A y B para el TPBS₃)

- No se hizo

TABLA I-B

PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LAS PROTEINAS DE
LOS EXTRACTOS DE TABACO *

Extracto salino de tabaco	Concentración proteica (mg/ml)****	Título de aglutinación **	CIEP ***
TPBS ₂	0.37 (7.7 ml)	0	4
TSDS ₂	0.17 (7.5 ml)	0	4
TTW-20 ₂	0.19 (6.8 ml)	0	4
TTR-x-100 ₂	0.35 (8.2 ml)	0	2

* Obtenidos por precipitación con sulfato de amonio

** Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

***Se enfrentaron los extractos a los sueros anti tabaco producidos en conejo B

****Volumen total dentro del paréntesis

TABLA I-C

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS
 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN LOS
 EXTRACTOS DE TABACO *

Tipo de extracto salino de tabaco	Rf	Peso molecular
TTR-x-100 ₁	0.48	5.0 X 10 ⁴
	0.63	3.3 X 10 ⁴
	0.90	1.55 X 10 ⁴
TPBS ₃	0.36	6.8 X 10 ⁴
	0.46	5.2 X 10 ⁴
	0.61	3.5 X 10 ⁴
	0.86	1.6 X 10 ⁴

* Por electroforesis en geles de PAA-SDS

TABLA 11

CARACTERISTICAS DE LOS ANTISUEROS ANTITABACO

Antisuero de conejo	Concentración proteica (mg/ml) ^{****}	Titulo de aglutinación *	CIEP
A	81 (10 ml)	1:2	1 a 2 ^{**}
B	71 (12 ml)	1:64	2 a 4 ^{***}

* Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo

** Se usaron los 4 extractos de tabaco subíndice 1

*** Se usaron los 4 extractos de tabaco subíndice 2

**** Volumen total dentro del paréntesis

TABLA III

CARACTERISTICAS DE LOS COMPLEJOS INMUNES FORMADOS "IN VITRO" ENTRE
ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO.

Extracto + antisuero conejo	Concentración proteica (mg/ml) *	Título de aglutinación **	Precipitación capilar ***	CIEF ****		MDID		Electroforesis en geles de PAA-SDS	
				Ag	Ac	Ag	Ac	Bandas	Peso molecular
TPBS ₁ + A	49	1:8	0	0	2	0	1	1	6 X 10 ⁴
TSDS ₁ + A	51	1:32	0	0	1	0	1	0	
TTW-20 ₁ + A	40	1:32	1:1	0	1	0	1	1	4.4 X 10 ⁴
TTR-X-100 ₁ + A	42	1:32	0	0	1	0	0	0	
TPBS ₂ + B	46	1:32	1:1	1	1	-	-	1	5.6 X 10 ⁴
TSDS ₂ + B	44	1:32	1:1	0	1	-	-	1	5.0 X 10 ⁴
TTW-20 ₂ + B	36	1:32	1:2	2	2	-	-	1	4.2 X 10 ⁴
TTR-X-100 ₂ + B	52	1:32	1:4	0	1	-	-	1	4.8 X 10 ⁴
TPBS ₃ + B	-	-	1:4	-	-	-	-	1	4.8 X 10 ⁴

* El volumen total para todas las mezclas de extractos y antisueros es de 1.5 ml

** Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo

*** Se mantuvo constante la concentración de suero y se varió el del extracto de tabaco

**** Se usó un modelo de CIEF de 3 pozos; el pozo No.1 con el extracto, el No.2 con la mezcla de extracto + antisuero y el No.3 con antisuero de conejo.

- No se hizo

TABLA IV

ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO
EN EL SOBRENADANTE DE COMPLEJOS INMUNES FIJADOS A MACROFAGOS

ALVEOLARES *

Extracto+Antisuero de conejo	Concentración proteica (mg/ml) **
TPBS ₁ + A	0.15 (1.1 ml)
TSDS ₁ + A	0.10 (1.1 ml)
TTW-20 ₁ + A	0.17 (1.1 ml)
TTR-X-100 ₁ + A	0.19 (1.1 ml)
TPBS ₂ + B	0.07 (1.1 ml)
TSDS ₂ + B	0.03 (1.1 ml)
TTW-20 ₂ + B	0.07 (1.1 ml)
TTR-X-100 ₂ + B	0.05 (1.1 ml)
TPBS ₃ + B	0.07 (1.1 ml)

* Complejos inmunes formados "in vitro", incubados
con macrófagos alveolares.

** Volumen total dentro del paréntesis

CARACTERISTICAS DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE
TABACO MEZCLADOS CON SSB.

Extracto de tabaco	Titulo de aglutinacións	CIEF **	MDID
TPBS ₁ + SSB	1:2	1	1
TSDS ₁ + SSB	1:1	2	0
TTW-20 ₁ + SSB	1:4	1	1
TTR-X-100 ₁ + SSB	0	0	0
TPBS ₂ + SSB	0	0	-
TSDS ₂ + SSB	0	0	-
TTW-20 ₂ + SSB	0	0	-
TTR-X-100 ₂ + SSB	0	0	-
TPBS ₃ + SSB	0	1	-

* Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

** Se usó un modelo de CIEF de 3 pozos; el pozo No.1 con el extracto, el No.2 con extracto y SSB y el No.3 con suero de conejo.

- No se hizo

TABLA VI
 CARACTERISTICAS DE LOS ANTISUEROS ANTITABACO MEZCLADOS
 CON SSB.

Antisuero de conejo	Título de aglutinación*	CIEF				
		Bandas	TPBS ₂	TSDS ₂	TTW-20 ₂	TTR-X-100 ₂
A + SSB	1:32	1	-	-	-	-
B + SSB	1:32	1 a 4	3	1	4	2

* Se emplearon eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

- Se enfrentó solamente contra TPBS₁

TABLA VII-A

MICROHEMAGLUTINACION DEL
EXTRACTO SALINO DE TABACO
CON ANTISUERO DE CONEJO (B)

No. Fracción	Título de aglutinación *
1-16	0
17	1:2
18-21	1:8
22-23	1:2
24	1:4
25-28	1:1
29-38	0
39	1:1
40	1:2
41-50	0

* Se usaron eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

TABLA VII-B

MICROHEMAGLUTINACION DEL
EXTRACTO DE TABACO-SDS₂
CON ANTISUERO DE CONEJO (B)

No. Fracción	Título de aglutinación *
1-22	0
23-26	1:1
27-28	1:2
29-30	1:1
31-36	0
37-43	1:1
44-50	0

* Se usaron eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo

TABLA VII-C

MICROHEMAGLUTINACION DEL
EXTRACTO DE TABACO-TW-20₂
CON ANTISUERO DE CONEJO (B)

No. Fracción	Título de aglutinación ●
1-19	0
20-21	1:1
22-29	0
30	1:1
31-50	0

● Se usaron eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

TABLA VII-D

MICROHEMAGLUTINACION DEL
 EXTRACTO DE TABACO-TR-X-100₂
 CON ANTISUERO DE CONEJO (B)

No. Fracción	Título de aglutinación *
1-19	0
20	1:2
21-27	1:1
28	1:2
29	1:1
36-50	0

* Se usaron eritrocitos glutaraldehizados del grupo sanguíneo A Rh positivo.

TABLA VIII

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE PACIENTES CON IAM CONTRA
ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO.

FUMADORES								
No. Pacientes	Sexo		Edad Promedio (años)	Tabaquismo Promedio (años)	CIEF			
	F	M			Anticuerpo *		Antígeno **	
					Positividad	Bandas	Positividad	Bandas
38	18%	82%	58.5 [±] 12.1	29.5 [±] 17.9	36/38 94.7%	1-3	9/38 23.6%	1-2
NO FUMADORES								
11	27%	73%	62.5 [±] 19.0	0	11/11 100%	1-3	3/11 100%	1

* Se enfrentaron los sueros contra TPBS₃

** Se enfrentaron los sueros contra antisuero de conejo B

TABLA IX

ANALISIS DE LOS COMPLEJOS INMUNES DE SUEROS DE PACIENTES CON IAM
 POR ELECTROFORESIS EN GELES DE PAA-SDS

FUMADORES							
No. Pacientes	Sexo		Edad Promedio (años)	Tabaquismo Promedio (años)	Electroforesis en geles de PAA-SDS		
	F	M			Positividad	Bandas	Peso molecular
38	18%	82%	58.5 [±] 12.1	29.5 [±] 17.9	30/32 93.7%	1-7	1.8x10 ⁴ -1.7x10 ⁵
NO FUMADORES							
11	27%	73%	62.5 [±] 19.0	0	9/10 90%	1-4	1.6x10 ⁴ -1.7x10 ⁵

TABLA X

ANALISIS INMUNOFLORESCENTE DE LOS COMPLEJOS INMUNES
 TABACO-ANTITABACO UNIDOS A MACROFAGOS ALVEOLARES
 Y PROVENIENTES DE SUEROS DE PACIENTES CON IAM

FUMADORES						
No. Pacientes	Sexo		Edad Promedio (años)	Tabaquismo Promedio (años)	Fluorescencia	
	F	M			Positividad	%CF *
38	18%	82%	58.5 [±] 12.1	29.5 [±] 17.9	15/15 100%	14
NO FUMADORES						
11	27%	73%	62.5 [±] 19.0	0	5/5 100%	10

* CF. Células fluorescentes promedio

TABLA XI

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE INDIVIDUOS DONADORES DE SANGRE
CONTRA ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO

FUMADORES								
No. Personas	Sexo		Edad Promedio (años)	Tabaquismo Promedio (años)	CIEF			
	F	M			Anticuerpo *		Antígeno **	
					Positividad	Bandas	Positividad	Bandas
42	12%	88%	28 [±] 7.4	11 [±] 8.0	39/42 92.8%	1-3	1/42 2.3%	1
NO FUMADORES								
5	60%	40%	23 [±] 4.4	0	4/5 80%	1-2	0/5 0%	0

* Se enfrentaron los sueros contra TPBS₃

** Se enfrentaron los sueros contra antisuero de conejo B

TABLA XII

ANALISIS DE LOS SUEROS DE DONADORES DE SANGRE POR ELECTROFORESIS EN GELES DE PAA-SDS

FUMADORES							
No. Personas	Sexo		Edad Promedio (años)	Tabaquismo Promedio (años)	Electroforesis en geles de PAA-SDS		
	F	M			Positividad	Bandas	Peso molecular
42	12%	88%	28 [±] 7.4	11 [±] 8.0	25/42 59.5%	1-5	5.4x10 ⁴ -1.7x10 ⁵
NO FUMADORES							
5	60%	40%	23 [±] 4.4	0	4/5 80%	1-3	5.8x10 ⁴ -1.7x10 ⁵

FIGURAS

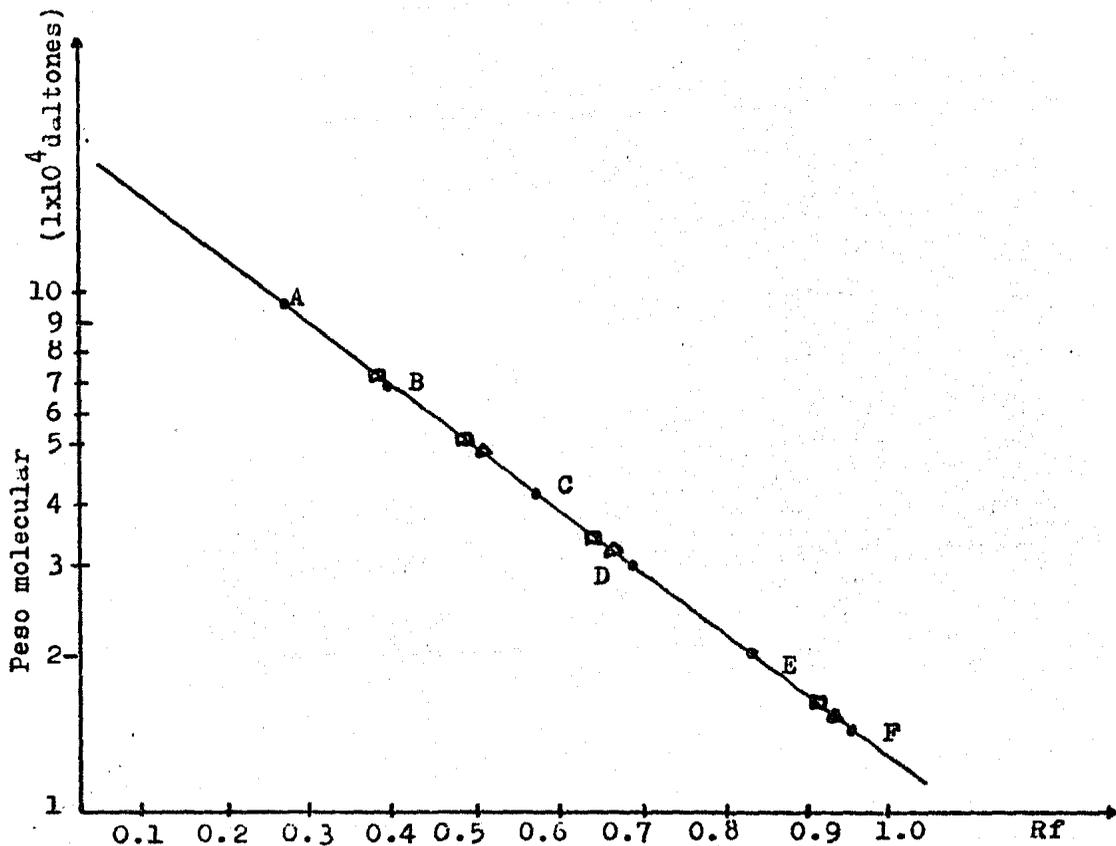


Figura 1. Se presenta el peso molecular de las sustancias patrón en electroforesis de PAA-SDS, donde:

A: Fosfatasa b (94 000 daltones)

B: Albúmina (67 000 daltones)

C: Ovoalbúmina (43 000 daltones)

D: Anhidrasa carbónica (30 000 daltones)

E: Inhibidor de tripsina (20 100 daltones)

F: α -lactalbúmina (14 400 daltones)

□: TPBS₃

△: TTR-X-100₁ (ver tabla I-C).

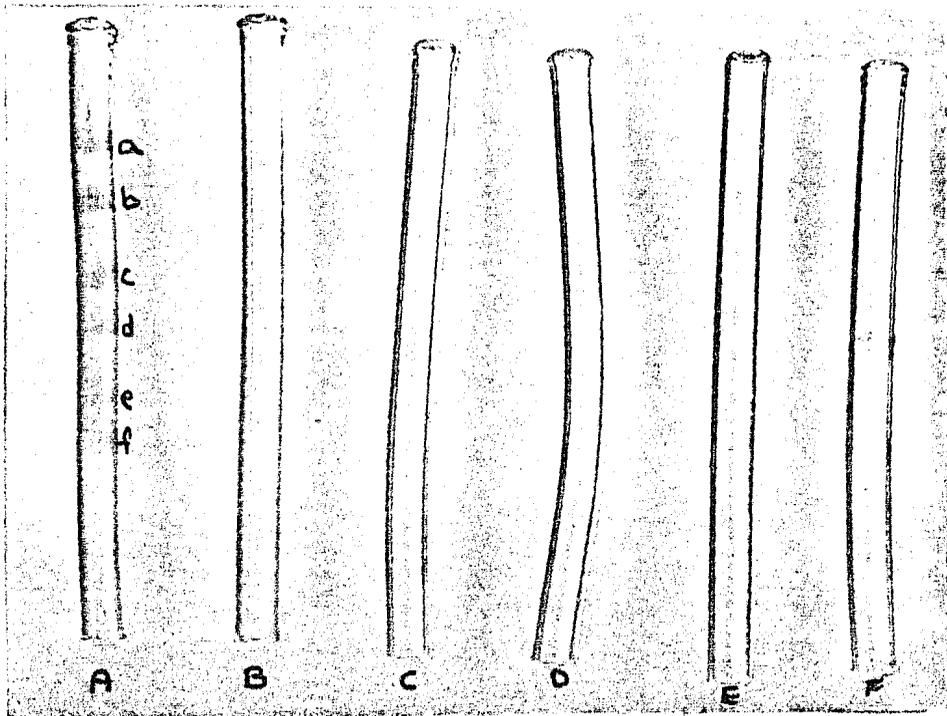


Figura 2. Se muestra la electroforesis en gel de PAA-SDS de:

- A) El corrimiento de proteínas de peso molecular conocido:
 - a) Fosfatasa b (94 000 daltones), b) Albúmina (67 000 daltones), c) Ovoalbúmina (43 000 daltones), d) Anhidrasa carbónica (30 000 daltones), e) Inhibidor de tripsina (20 100 daltones) y f) α -lactalbúmina (14400 daltones).
- B) Extracto de tabaco con PBS
- C) El precipitado obtenido con PEG 6000 de un suero de un individuo normal no fumador.
- D) El material fue obtenido en forma similar al anterior pero de un sujeto normal fumador.
- E) En este gel se usó el precipitado obtenido de un paciente con IAM no fumador.
- F) Aquí se observa la banda de 5.2×10^4 daltones al correr el precipitado de un suero de un paciente con IAM y fumador.

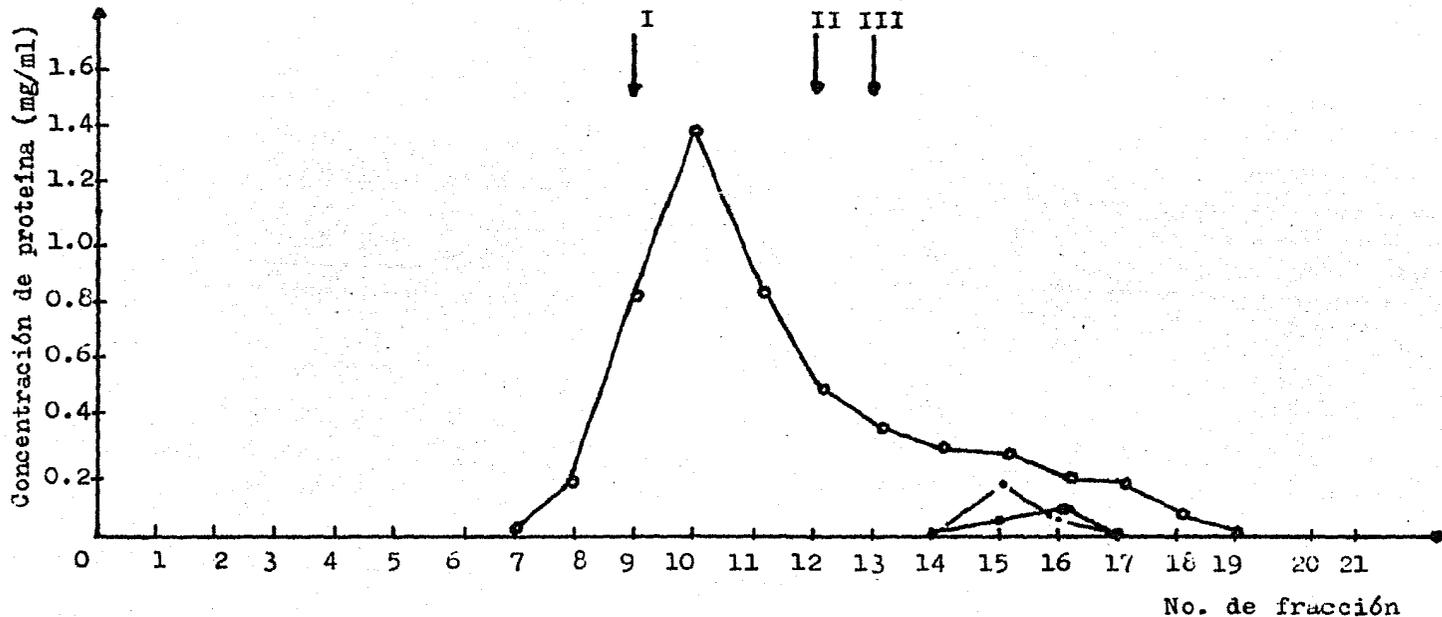


Figura 3. Cromatografía del suero de conejo y de los diferentes extractos salinos de tabaco en Sephacryl S-200 mostrando la concentración de proteína para cada una de las fracciones obtenidas. Las flechas corresponden a los patrones de peso molecular.

I: Dextran azul (2×10^6 daltones)

II: ASB (67 500 daltones)

III: Citocromo C (12 348 daltones)

Donde:

—●—: TPBS₁ + SSB - - -●- - -: TSDS₁ + SSB —○—: Suero de conejo inmunizado A + SSB

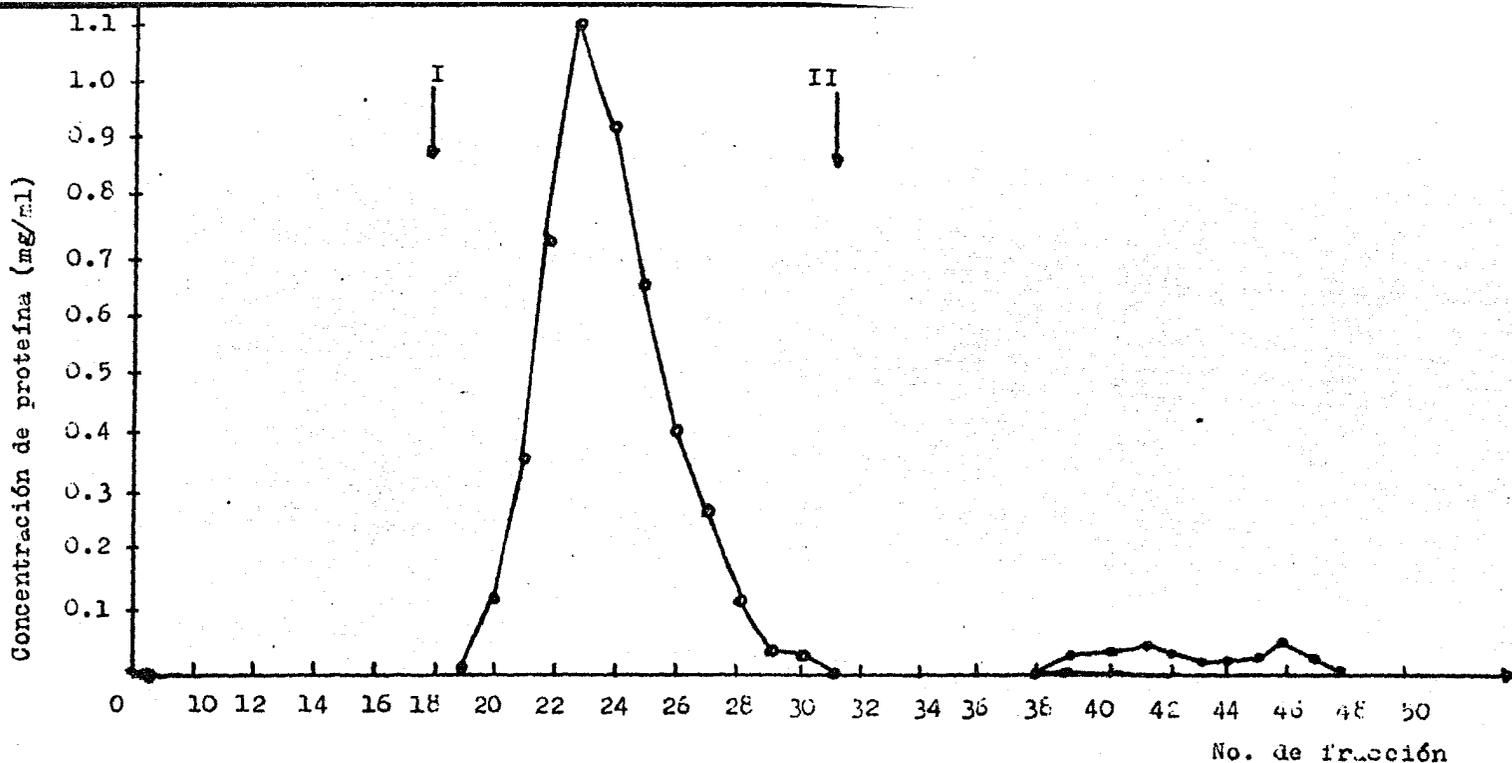


Figura 4. Cromatografía del suero de conejo y del extracto de tabaco en Sephacryl S-200 mostrando la concentración de proteína para cada una de las fracciones. Las flechas corresponden a los patrones de peso molecular.

I: Dextran azul (2×10^6 daltones) II: Citocromo C (12 348 daltones)

Donde:

—●— : TPBS₃ + SSB

—○— : Suero de conejo inmunizado B + SSB

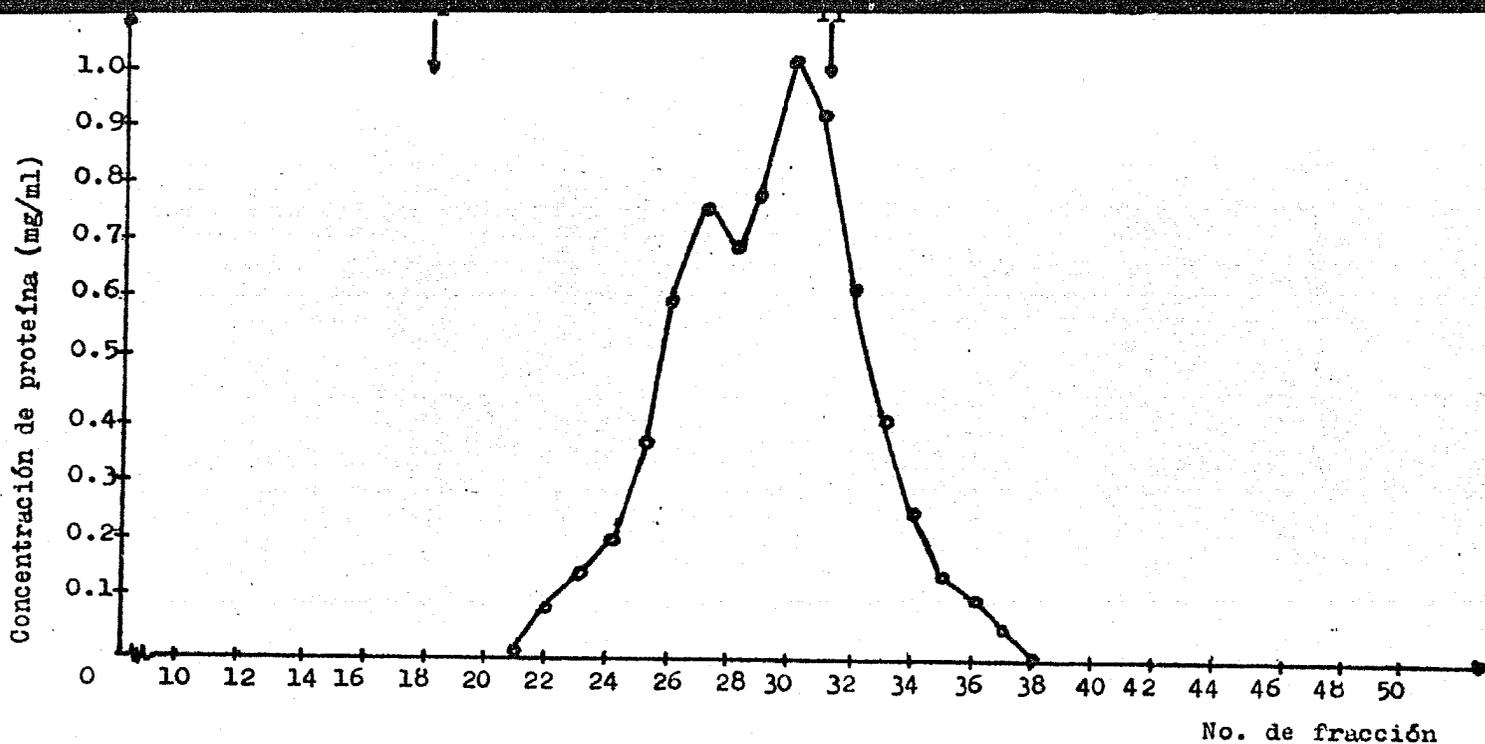


Figura 5. Cromatografía de suero humano de IAM en Sephacryl S-200 mostrando la concentración de proteína para cada fracción. Las flechas corresponden a patrones de peso molecular.

I: Dextran azul (2×10^6 daltones)

II: Citocromo C (12 348 daltones)

Donde:

—○—: Suero humano de IAM + SSB

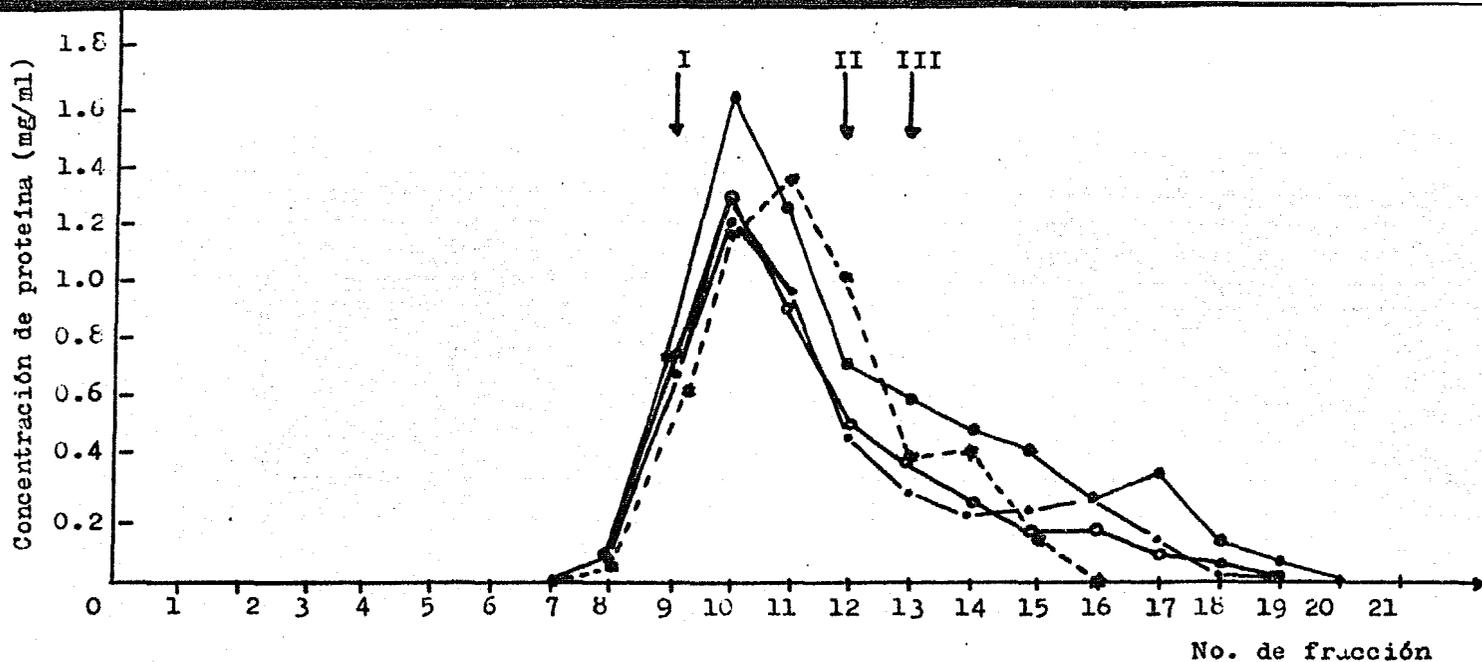


Figura 6. Cromatografía de los complejos inmunes formados "in vitro" con antígenos de tabaco y suero antitabaco, mostrando la concentración de proteína para cada una de las fracciones. Las flechas corresponden a patrones de peso molecular.

I: Dextran azul (2×10^6 daltones)

II: ASB (67 500 daltones)

III: Citocromo C (12 348 daltones)

Donde:

—●—: TPBS₁ + suero de conejo A —○—: TTW-20₁ + suero de conejo A
 -●-: TSDS₁ + suero de conejo A -○-: TTR-X-100₁ + suero de conejo A

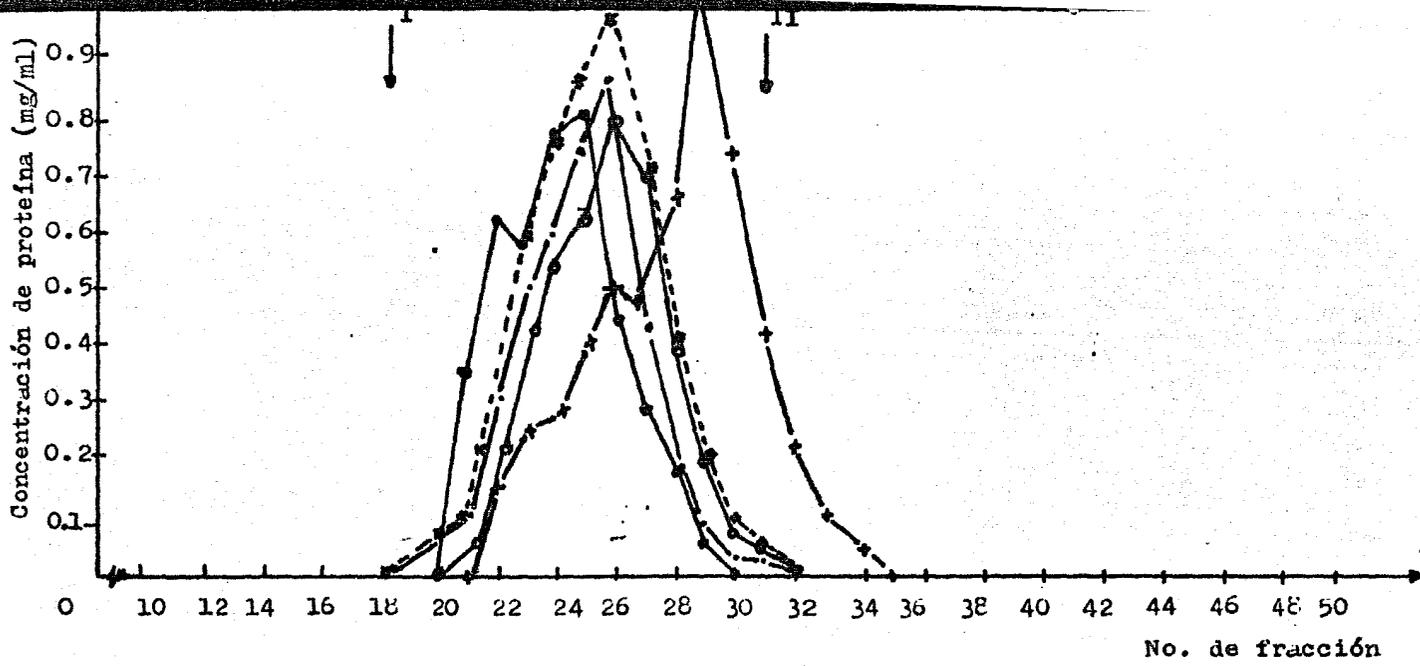


Figura 7. Cromatografía de los complejos inmunes formados "in vitro" con antígenos de tabaco y suero antitabaco, mostrando su concentración de proteína para cada una de las fracciones. Las flechas corresponden a patrones de peso molecular.

I: Dextran azul (2×10^6 daltones)

II: Citocromo C (12 348 daltones)

Donde:

- : TPBS₂ + suero de conejo B
- : TSDS₂ + suero de conejo B
- ◇—: TFW-20₂ + suero de conejo B

- - ■ - - : TTR-X-100₂ + Suero de conejo B
- +—: TPBS₃ + Suero de paciente con IAM

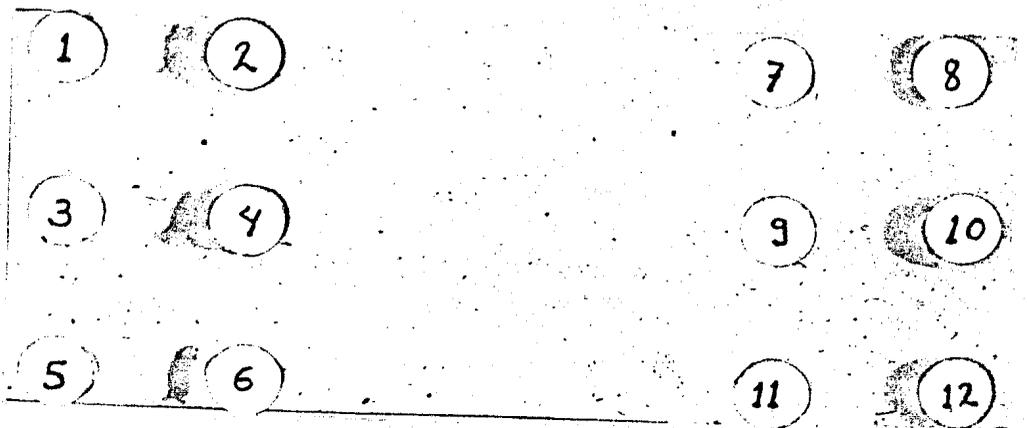


Figura 8. Se muestra una CIEF en donde se enfrentan:

1,3,5,7,9 y 11 : TPBS₃

2,4,6,8,10 y 12 : Sueros de pacientes fumadores con IAM.

DISCUSION

PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LOS EXTRACTOS DE TABACO.

Con el extracto de tabaco, subíndice 3, se logró una concentración proteica mucho mayor que en los extractos subíndice 1 y 2, lo que le da más poder antigénico, que se comprobó al pasarlo por electroforesis en geles de PAA-SDS, obteniéndose hasta 4 bandas de proteína. Una de estas bandas tuvo un peso molecular de 16 000 daltones, valor aproximado a la glicoproteína de tabaco que encontró Becker (15). Las otras bandas tienen pesos moleculares mayores, lo que se puede deber a que son cadenas polipeptídicas que no se disociaron completamente. Con respecto a los otros extractos salinos solamente se obtuvieron - bandas con el TR-X-100₁ que contenía mayor concentración de - proteína, y en el cual se encontraron 3 bandas, una de 15 500 daltones y las otras 2 con un peso molecular mayor.

Se observó que los extractos precipitados con sulfato de amonio (subíndice 2) presentaron hasta 4 bandas de precipitación por CIEF que los extractos subíndices 1 y 3, lo cual indica que los antígenos presentes en el tabaco posiblemente son proteínas y que entre más purificadas esten se podrá establecer - mejor su especificidad.

En este trabajo resultó ser más eficiente el ensayo de CIEF que el de MDID, para la identificación de la reacción entre - los extractos salinos subíndice 2 con los antisueros de conejo.

Los extractos subíndice 2 no aglutinaron eritrocitos, ni - tampoco con el TPBS₃, ni TTR-X-100₁; pero con el TPBS₁, TSDS₁ y TTW-20₁ se tienen títulos de 1:2, 1:1 y 1:1 respectivamente; - lo que probablemente se debe a que la reacción sea mediada por un oligosacárido ó polisacárido ó por otra sustancia no protei - ca.

PROPIEDADES DE LOS ANTISUEROS ANTITABACO.

Los 2 sueros de conejos A y B inmunizados con extracto salino de tabaco tuvieron una concentración proteica de 81 y 71 mg/ml. El suero que presentó mayor número de bandas de precipitación por CIEF fue el del conejo B, apoyándose que se reconoce a más de un antígeno del extracto salino de tabaco.

PRUEBAS INMUNOSEROLÓGICAS DE LOS COMPLEJOS INMUNES FORMADOS "IN VITRO" ENTRE ANTIGENOS DE TABACO Y ANTISUEROS ANTITABACO.

Las mezclas de los antisueros y los extractos salinos de tabaco presentaron un exceso de anticuerpo que se pudo demostrar mediante los inmunoensayos de CIEF y MDID, indicando que todo el antígeno presente se unió con el anticuerpo y formó un precipitado de complejos inmunes.

La formación de complejos inmunes se pudo observar en la precipitación capilar con los extractos subíndice 1 (TTW-20₁) y en todos los del subíndice 2 y 3. La cantidad de complejos inmunes formados varió de un extracto a otro dependiendo de la concentración de antígeno que se encontraba, siendo mayor en el TPBS₂, TTR-X-100₂ y TPBS₃, en los cuales hubo formación de complejos inmunes hasta la dilución 1:4. En los extractos en los que no hubo formación de complejos inmunes visibles macroscópicamente pudo haberse debido a que existía un exceso de anticuerpo y los complejos formados eran solubles.

Al probarse estas mezclas por electroforesis en geles de PAA-SDS, para determinar el peso molecular de los componentes de los complejos inmunes formados "in vitro", se encontró que los extractos que habían dado precipitado visible en los capilares tuvieron una banda de proteína cuyo peso molecular estuvo comprendido entre 4.2×10^4 y 6.0×10^4 daltones y que pue-

de corresponder a los antígenos del tabaco ó a cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina. En los que no se observaron complejos inmunes, solamente uno de ellos (TPBS₁) presentó una banda, siendo negativos los de TSDS₁ y TTR-X-100₁. Lo anterior apoya la posibilidad de que en el TPBS₁ si se formaron complejos inmunes y que el antígeno estaba en pequeñas concentraciones. En las otras 2 mezclas no pudieron ser detectados los complejos - inmunes porque las concentraciones fueron menores y el método solo es positivo a concentraciones mayores. Por CIEF y MDID si se obtuvieron reacciones de precipitación con ambos extractos - (Tabla I-A) y la sensibilidad aproximada es de < 1 ug/ml y de < 10 ug/ml respectivamente.

ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS DE TABACO Y ANTICUERPOS ANTITABACO EN EL SOBRENADANTE DE COMPLEJOS INMUNES FIJADOS A MACROFAGOS ALVEOLARES.

El análisis realizado en el sobrenadante de la incubación de macrófagos alveolares con complejos inmunes tabaco-antitabaco reveló una concentración proteica baja, lo que quiere decir, -- que existía proteína que podía provenir del antisuero ó del extracto, pero que no fue suficiente para poderla identificar en la CIEF y microhemaglutinación.

Esto mismo fue observado al utilizar controles de extracto de tabaco, en los que se les añadió una cantidad semejante de SSB para simular la dilución hecha con el antisuero de conejo y viceversa. El análisis de estos datos revela que puede existir la posibilidad de que el anticuerpo y el antígeno solos, - puedan ser captados por los macrófagos alveolares ó que su baja concentración proteica detectada en el sobrenadante no fue la suficiente como para demostrar su presencia.

EXTRACTOS SALINOS DE TABACO Y ANTISUEROS PROCESADOS POR CROMATOGRAFIA EN SEPHACRYL S-200.

Los diferentes extractos de tabaco pasados por la columna de Sephacryl S-200 presentaron 1 pico pequeño con la determinación de proteína por el método de Lowry y col.(33), o sea que el extracto de tabaco contenía poca cantidad de antígeno y que cuando se les añadió SSB para tener la misma concentración que con el antisuero de conejo, se diluyó y no se detectó en las fracciones obtenidas, además su peso molecular fue menor de 12 348 daltones (con respecto al citocromo C) comparativamente con la glicoproteína descrita por Becker (15) que tiene un peso molecular aproximadamente de 18 000 daltones.

Cuando se usó una columna más larga para mejorar la separación, las muestras se diluyeron aún más, y no se encontró proteína en estas fracciones por el método de Lowry y col. (33); a excepción del TPBS₃ en el que se tuvo proteína en pequeñas concentraciones (0.05 mg/ml).

Con los antisueros de conejo (A y B) se confirmó la presencia de proteínas al revelarlas por el método de Lowry y col.

La modificación del tamaño de las columnas en las muestras de sueros (antisuero de conejo B y suero humano de un paciente con IAM) también fueron afectadas por la dilución, pero aún así se lograron separar sus componentes por peso molecular.

COMPLEJOS INMUNES FORMADOS "IN VITRO" CON ANTIGENOS DE TABACO Y ANTISUERO ANTITABACO PROCESADOS POR CROMATOGRAFIA EN SEPHACRYL S-200

Los picos obtenidos en las columnas para las mezclas de los diferentes extractos con el antisuero de conejo fueron similares a los observados con los antisueros de conejo solos, lo -

cual apoyaría que fueron pocos los complejos inmunes formados "in vitro", antes de procesarlos por la columna, y que al diluirse no se pudieron detectar por los métodos empleados en las fracciones obtenidas; además, existía un exceso de anticuerpo, el cual se volvió a encontrar en las fracciones por el método de Lowry y col. (33), aunque esta concentración de proteína no fue suficiente para demostrarlo por CIEF.

Al procesar las muestras en una columna de mayor altura se pudo hacer una mejor separación de los componentes.

ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS INMUNES EN EL SUERO DE PACIENTES CON IAM.

Se demostró la existencia de anticuerpos circulantes en el 94.7% de los sueros de pacientes con IAM fumadores y en un 23.6% de ellos también se logró detectar antígeno de tabaco, aún cuando por su misma enfermedad se les había prohibido seguir fumando.

En los sueros de pacientes no fumadores se encontró que por CIEF el 100% tuvo anticuerpo libre. El 27.2% reaccionó contra antisuero antitabaco de conejo, pero se requiere revisar si el antisuero de conejo reacciona con alguna proteína del suero humano ó con algún antígeno de tabaco presente en el suero de pacientes no fumadores. El alto porcentaje de positividad obtenido en los no fumadores se pudo haber presentado porque fue bajo el número de sueros colectados y se requieren más sueros de los no fumadores para que los resultados obtenidos fueran significativos.

En el sobrenadante proveniente de la incubación de complejos inmunes con macrófagos alveolares se detectó baja concentración de proteína, lo que posiblemente sea de los mismos complejos -

inmunes que no se unieron a la membrana del macrófago, ya que no existe la posibilidad de que sean anticuerpos ó antígenos - solos porque el suero fue precipitado con PEG 6000 y este método separa los complejos inmunes aún a bajas concentraciones de estos complejos y deja libres a los antígenos y anticuerpos solubles. Estos complejos inmunes no se detectaron por la ausencia de antígeno y anticuerpo libres.

Cuando los complejos inmunes se disociaron mediante calentamiento y tratamiento con SDS y se les procesó por electroforesis, se logró demostrar la presencia desde 1 hasta 7 bandas de proteína en el 93.7% de los sueros de fumadores y de 1 a 4 bandas en el 90% de los no fumadores y con pesos moleculares semejantes en ambos casos. Una de las bandas de proteína identificadas tuvo un peso molecular aproximado al de la glicoproteína de tabaco encontrada por Becker (15) y las demás tuvieron pesos moleculares hasta de 1.7×10^5 , lo que significa que el complejo inmune si estaba compuesto por antígeno de tabaco y anticuerpo antitabaco, posiblemente de la clase IgG. Esto no pudo ser demostrado más específicamente cuando los complejos inmunes unidos a los macrófagos alveolares se disociaron con SDS y posteriormente se les procesó por electroforesis y porque la muestra se diluyó y la concentración de proteína no fue suficiente para su determinación.

Se demostraron mediante el análisis de inmunofluorescencia los complejos inmunes adheridos a la membrana de los macrófagos, ya que la antigammaglobulina humana fluoresceinada se unió al anticuerpo del complejo inmune, siendo mayor el número de células fluorescentes en los fumadores que en los no fumadores. Sin embargo, los macrófagos tienen receptores para Fc de inmunoglobulina por lo que se propone que los anticuerpos sean de esta clase.

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE INDIVIDUOS DONADORES DE SANGRE
CONTRA ANTIGENOS DE TABACO.

El 92,8% de los sueros de individuos donadores fumadores - mostraron tener anticuerpos contra tabaco y solamente en un donador se encontró el antígeno libre. En el caso de los no fumadores también hubo hasta un 80% de positividad de anticuerpo - pero no de antígeno, indicándonos los resultados que ambos grupos, estando o no en contacto directo con el cigarrillo, desarrollan una respuesta inmune humoral contra el tabaco, siendo mayor en fumadores activos que en pasivos, ya que se llagaron a identificar hasta 3 bandas de precipitación, o sea, que los fumadores desarrollan anticuerpos específicos contra 3 de los antígenos del tabaco y en los no fumadores solamente se reconocieron hasta 2 de ellos.

El procesamiento de los sueros por electroforesis en geles de PAA-SDS no reveló la existencia de la glicoproteína del tabaco identificada por Becker y col.(15) ya que solamente se tuvieron proteínas de peso molecular comprendido entre 5.4×10^4 y 1.7×10^5 , por lo que posiblemente se trate de IgG.

En el grupo de donadores fumadores y no fumadores no se puede apoyar que los complejos inmunes esten compuestos por antígenos de tabaco y anticuerpos antitabaco, ya que solamente han desarrollado una respuesta inmune humoral contra el tabaco y que no es patogénico en estas condiciones.

CONCLUSIONES

- 1) Los extractos salinos de tabaco son inmunógenos para el conejo.
- 2) La purificación parcial de los antígenos de tabaco con sulfato de amonio permitió postular la existencia de cuando menos 4 antígenos, y que probablemente estos son de características proteicas. Una de ellas puede corresponder a una glicoproteína de 18 000 daltones y que contiene fierro.
- 3) Los pacientes fumadores con IAM tuvieron anticuerpos antitabaco en el 94.7% de los casos demostrables por CIEF. En los individuos donadores de sangre y en los pacientes con IAM no fumadores se presentaron anticuerpos antitabaco en un 80% y 100% de los casos respectivamente; sin embargo, el número de sueros estudiados fue bajo, por lo que consideramos que se requiere incrementar el número de individuos estudiados para tener mayor certeza de esta positividad en contra de los antígenos del tabaco. Lo anterior permitirá hacer propuestas concretas sobre la importancia, o no, de los anticuerpos antitabaco en la inmunopatogenia de las enfermedades cardiovasculares.
- 4) Para demostrar la presencia de antígenos del tabaco en el suero de fumadores se empleo un antisuero antitabaco obtenido en conejos, la reactividad pudiera corresponder a la reacción de ese complejo antígeno-anticuerpo, pero cabe la posibilidad de que el suero antitabaco contenga anticuerpos contra proteínas séricas humanas, como puede observarse en conejos hiperinmunizados que elaboran factor reumatoide.
- 5) La presencia de complejos inmunes circulantes en el suero de pacientes con IAM se demostró por el estudio de inmunofluorescencia.
- 6) Los complejos inmunes circulantes estuvieron presentes en

la sangre de los pacientes no fumadores y fumadores con IAM. Existe la posibilidad de que este complejo contenga la glicoproteína de 18 000 daltones.

- 7) Por todos los resultados obtenidos con los diferentes métodos se confirma que el suero de pacientes con IAM fumadores y no fumadores, contienen anticuerpos libres y los complejos inmunes circulantes que reconocen al tabaco y por lo tanto sería conveniente estudiar su inmunopatogenicidad, así como su participación en el desarrollo del IAM considerando además que existen múltiples factores que intervienen en la evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rojas, W.: *Inmunología*, 4a. ed., Ed. Colina, Colombia, 1, -- 1978.
- 2) Fudenberg, H., Stites P.D., Caldwell L.J. and Wells V.J.: *Inmunología Clínica*, 3a. ed., Ed. El Manual Moderno S.A., México, 29, 1982.
- 3) Dixon, F.J. and Kunkell, H.G.: The biology and detection of immune complexes, *Advances in Immunology*, 28:89, 1979.
- 4) Hawn, C.V.Z., and Janeway, C.A.: Histological and serological sequences in experimental hypersensitivity, *J.Exp.Med.*, 85:571, 1947.
- 5) Germuth, F.C.: A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type, *J.Exp.Med.*, 97:257, 1953.
- 6) Dixon, F.J.: The role of antigen-antibody complexes in disease, *Harvey Lect.*, 58:21, 1963.
- 7) Dixon, F.J., Vazquez, J.J., Weigle, W.D. and Cochrane, C.G.: Pathogenesis of serum sickness, *Arch. Pathol.*, 65:18, 1958.
- 8) Braval, L and Slomianski, R.: *Tabaquismo*, *Información Científica y Tecnológica*, 3:27, 1981.
- 9) Hutchinson, J.: *The families of flowering plants*, 2a. ed., - Oxford University Press, 484, 1959.
- 10) Lawrence, H.M.G.: *Taxonomy of vascular plants*, 4a. ed., The Macmillan Company, New York, 693, 1959.
- 11) Janick, J., Schery, R.W., Wodt, F.W. and Ruttan, V.W.: *Plant science an introduction to world crops*, 2a. ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco, 543, 1974.

- 12) Larson, P.S., Haay, H.B. and Silvette, H.: Tobacco experimental and clinical studies, The Williams and Wilkins Co., 553, 1961.
- 13) Harkavy, J.: Tobacco sensitization in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 36:381, 1937.
- 14) 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.
- 15) Becker, C.G., Dubin, T. and Wiedermann, H.P.: Hypersensitivity to tobacco antigen, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 73:1712, 1976.
- 16) Lehrer, S.B., Wilson, M.R. and Salvaggio, J.E.: Immunogenic -- properties of tobacco smoke, J. Allergy. Clin. Immunol. 62:368, 1978.
- 17) Gleich, G.J. and Welsh, P.W.: Immunochemical and physicochemical properties of tobacco extracts, Am. Rev. Resp. Dis., 120:995, 1979.
- 18) Becker, C. and Dubin, T.: Activation of factor XII by tobacco glycoprotein, J. Exp. Med., 146:457, 1977.
- 19) 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.
- 20) Levi, R.M.D., Zavec, J.H., Burke, J.A.M.S. and Becker, C.G.: Cardiac and pulmonary anaphylaxis in guinea pigs and rabbit induced by glycoprotein isolated from tobacco leaves and cigarette smoke condensate, Am. J. Pathol. 106:318, 1982.

- 21) 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.
- 22) Romanski, B., Broda, S. and Swiathowski, 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.
- 23) Romanski, B., Broda, S., Swiathowski, M. and Zbikowska: 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, *Allergol. Immunopathol.* 7:187, 1979.
- 24) Romanski, B., Broda, S., Swiatkowski, M. and Zbikowska-Gotz: The immunologic response to tobacco antigens in smokers. V. - Plasma concentrations of immunoglobulin and some complement components in tobacco hypersensitivity patients suffering from coronary artery disease, *Allergol. Immunopathol.* 9:487, 1981.
- 25) Szundy, E., Zsuzsa, M., Füst, G. and Székely, J.: Serial measurement of circulating immune complexes in myocardial infarction, *Br. Heart J.*, 46:93, 1981.
- 26) Schuman, L.M.: Introduction and summary in smoking and health a report of the surgeon general, Sec. I, U.S. Government Printing Office, Washington, 3, 1979.
- 27) Lynch, G., Nightingale, T.E., Ellis, R.L. and Hoffman, D.: Cons-

tituents of tobacco smoke. In smoking and health a report of the surgeon general, U.S. Government Printing Office, Washington, 1, 1979.

- 28) Barona, P.A., Borunda, O., Luna, J., Ocaña, H. and Quezada, E.: - Tabaquismo, Rev. Fac. Med. UNAM (México), 24:6, 1981.
- 29) Ginns, L.C., Goldenhein, P.D., willer, L.G., Burton, R.C., Gillick, L. Colvin, R.B., Goldstein, G., Kung, P.C., Hurwitz, C. and Kozemi, H.: T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry, Am. Rev. Resp. Dis. 126:265, 1982.
- 30) Sordow, R.A., Lenfan, C.J.M., Frank, S., Schweizer, M. and Hurd, S.S: Nonneoplastic bronchopulmonary disease. In smoking and health a report of the surgeon general, U.S. Government --- Printing Office Washington, 1, 1979.
- 31) Preciado, A. y Martínez, R.D.: Estudio inmunológico del tabaco. XLV Congreso Nacional de Bioquímica, Clínica Guadalajara Jal. 179, 1982.
- 32) 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 Bio medicina 1982.
- 33) 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.
- 34) Onkelinx, E., Meuldermans, M. and Lontie, R.: Glutaraldehyde ag couplin reagent in passive hemagglutination, J. Immun. 16: 35, 1969.

- 35) Martínez, R.D., Pérez, M.S., Saldua, A. y Preciado, A.: Actividad de lectina en extractos del tabaco y de otras solanáceas. XLV Congreso Nacional de Bioquímica, Clínica Guadalajara, Jal., 180, 1982.
- 36) Martínez, R.D., Bialostosky, D. y Bassoti, R.: Estudio inmunoserológico en pacientes con infarto agudo del miocardio. I. Análisis inmunoserológico. Arch. Inst. Cardiol., México, - 48:414, 1978.
- 37) Wadsworth, C.: A microtechnique employing a gel chamber compared with other micro and macroplate technique for immunodifusión. Intern. Arch. Allergy. Appl. Immun., 21:131, - 1962.
- 38) Saldua, A.L.: Los anticuerpos anticorazón y anti-estreptococo en los padecimientos cardiovasculares. Tesis I.P.N. E.N.C.B., 1982.
- 39) Inman, R.D., Redecha, P.B., Knechtle, J.J., Schned, E.S., Rijn, I.V. and Christian, C.L.: Identification of bacterial antigens in circulating immune complexes of infective endocarditis. J. Clin. Invest., 70:271, 1982.
- 40) Martínez, R.D. and Montford, I.: A study of the specificity of alveolar macrophage antigens. J. Immun. 25:197, 1973.
- 41) Goldman, M.: Fluorescent antibody method, Academic Press, - New York, 1968.
- 42) Martínez, R.D. y Santos, G.: Rosette inhibition factor (s) in the sera of cardiopathic patients, Allergol. Immunopathol., 9:527, 1981.
- 43) Weber, K., and Osborn, M.: The reliability of molecular wei-

ght determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244:4406, 1969.

- 44) Nowohty, A.: Basic exercises in immunochemistry, 2a. ed., Springer-Verlag, New York, 251, 1979.
- 45) Bialostoky, D. and Dorbecker, N.: Radiological diagnosis of the left ventricular failure in acute myocardial infarction, Arch. Inst. Cardiol. (México), 45:720, 1974.