

001009

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EL PERFIL ANTIGÉNICO DEL TABACO  
Y EL ANÁLISIS DE LOS ANTICUERPOS  
CONTRA ANTÍGENOS DEL TABACO EN  
EL INFARTO DEL MIOCARDIO.

TESIS QUE PRESENTA EL Q.B. ARTURO LEOPOLDO PRECIADO LÓPEZ,  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL,  
CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN BIOQUÍMICA.

México, D.F. 1983.

U. A. M. ESTADÍSTICA DE CUATEM

P A R A :

MI FAMILIA

MI MADRE

MIS AMIGOS

*De manera especial agradezco al  
Dr. Rubén D. Martínez, la orientación  
en la realización de este trabajo y  
el valor inapreciable de sus enseñan  
zas y consejos como profesor y persona.*

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez siendo dirigida por los Doctores Rubén Darío Martínez (TUTOR), Ana Flisser de Martínez, José Miguel Betancourt y Esteban Celis (ASESORES). Contó con la eficaz colaboración del Médico Cirujano Hermelinda Barrientos; Q.F.I. Ana Lilia Saldúa y Pasante de Q.F.B. Socorro Pérez Magadan., a quienes agradezco su valioso apoyo.

## PROLOGO

En poliacrilamida-SDS, la glicoproteína de los extractos de tabaco, dió un peso molecular de 18000; en Sephadex G-100 no se obtuvo un promedio definido, sin embargo tienen una molécula con carga aniónica, definido por DEAE-Celulosa. Respecto a los anticuerpos antitabaco, el reconocimiento de los sistemas antígeno-anticuerpo fue establecido por contraelectroforesis, microdobleinmunodifusión y electroinmunodifusión obteniéndose los mejores resultados con la primera, llegandose a determinar hasta tres sistemas antígeno-anticuerpo. Así mismo resultó mejor inmunógeno el extracto salino que el condensado de humo y los resultados obtenidos por microdobleinmunodifusión en sujetos fumadores, fueron similares a los reportados en la literatura, pero no se encontró una diferencia notable en los porcentajes de positividad de los anticuerpos antitabaco en los sujetos sanos, infartados, fumadores y no, no encontrando una relación estrecha entre el infarto del miocardio y el tabaquismo.

## ABREVIATURAS

ES	EXTRACTO SALINO
ESS	EXTRACTO SALINO SONICADO
ESDS	EXTRACTO SALINO CON DODECILSULFATO DE SODIO.
ETX100	EXTRACTO SALINO CON TRITON-X-100
ET20	EXTRACTO SALINO CON TWEEN 20
CH	CONDENSADO DE HUMO
MID:	MICRODOBLEINMUNODIFUSION
CIEF:	CONTRAINMUNOELECTROFORESIS
EID:	ELECTROINMUNODIFUSION

## CONTENIDO

	PAG.
CAPITULO I	INTRODUCCIÓN..... 1
CAPITULO II	MATERIAL Y MÉTODOS..... 18
CAPITULO III	RESULTADOS..... 41
CAPITULO IV	DISCUSIÓN..... 77
CAPITULO V	CONCLUSIONES..... 86
CAPITULO VI	BIBLIOGRAFÍA..... 88

INTRODUCCION.



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

Todos los seres vivos están defendiendo su integridad biológica frente a una serie de agresiones externas. Para que éstos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos vertebrados disponen de sistemas especiales, encargados de identificar las sustancias propias y eliminar las "extrañas". En cada Phylum los mecanismos de defensa son diversos y heterogéneos, aunque siempre existe una actuación integrada de todos ellos en lo que se denomina la respuesta inmune (1).

Las sustancias que se comportan como "extrañas" a un organismo, frente a las cuales éste organiza una respuesta inmune se les conoce como inmunógenos ó antígenos, aunque éste último termino se emplea para definir la molécula que se combina con el anticuerpo y no necesariamente la que induce una respuesta inmune (1,2).

Los antígenos pueden ser de naturaleza proteica o macromoléculas puras o combinadas como las lipoproteínas, glicoproteínas, nucleoproteínas etc, los polisacáridos también son buenos inmunógenos. La antigenicidad o poder inmunogénico del antígeno, es la capacidad para inducir una respuesta

inmune. Esta propiedad esta dada por el grado de diferencia o identidad estructural del antígeno con las sustancias del organismo, de su peso molecular, protocolo de inmunización.

Una vez que el antígeno ha penetrado al organismo se establecen dos tipos de reacción inmunológica: a) respuesta humoral, que se manifiesta por la síntesis y secreción de anticuerpos y b) respuesta celular, donde las células sensibilizadas, son las efectoras de esta reacción.

Hay casos, en que los sistemas de defensa en sí, son causa de enfermedad y entonces se habla de reacciones de hipersensibilidad. En otras ocasiones, por razones no bien conocidas el sistema inmune reacciona frente a los componentes propios, que son destruidos, dando lugar a fenómenos de autoinmunidad. (2).

La respuesta inmune se caracteriza por su efectividad para eliminar aquellos antígenos contra los cuales se ha iniciado y desarrollado.

La respuesta esta mediada por los linfocitos, de los cuales se conocen dos poblaciones.

Los linfocitos B y los linfocitos T.

Los linfocitos B son aquellos que al ser activados por el antígeno, se diferencian en células plasmáticas que producen inmunoglobulinas específicas y que son las mediadoras de la respuesta inmune humoral.

Los linfocitos T, que se transforman en células sensibilizadas por contacto con el antígeno, son responsables de la respuesta celular. Esta clase de linfocitos es una población celular muy heterogénea y dependiendo de su actividad se han denominado: células T productoras de linfocinas, células T colaboradoras, células T citotóxicas y células T supresoras; todas con una acción definida en la respuesta inmune humoral y celular.

Es importante señalar la participación de los macrófagos, así como el concurso de las células asesinas (Killer) en el proceso de respuesta inmune.

En el ser humano se han descrito cinco clases de inmunoglobulinas que se denominan IgG, IgM, IgA, IgE e IgD con diferentes funciones y propiedades; están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, agrupadas en una o varias unidades estructurales dependiendo de su clase. La inmunoglobulina

o anticuerpo, una vez unida a los antígenos, puede facilitar la destrucción y eliminación de estos, pero requieren la colaboración de otras células y elementos como los macrófagos, los polimorfonucleares, otras células linfoides y del sistema de complemento.

Las linfocinas, son factores, de estructura y función heterogeneas entre los que podemos citar:

Factor inhibidor de la migración de macrófagos, al factor activador de los macrófagos, al factor blastogénico ó mitogénico, al factor de transferencia, al interferon. El número de linfocinas que se han encontrado, aumenta constantemente y existe una controversia sobre la existencia de una sola sustancia, o un número reducido con varias actividades biológicas (1,2,3).

A las diversas poblaciones de linfocitos se les ha caracterizado por los antígenos que poseen en la superficie de la membrana. Los linfocitos B, tienen estructuras membranales parecidas a las IgGs. que son capaces de combinarse con algunos antígenos. En los linfocitos T, se han mencionado los antígenos  $\emptyset$ , Ly, también se acepta que uno de los marcadores de la superficie es un receptor para eritrocitos de carnero, receptores para histamina y lectinas inclu

yen otros marcadores de membrana del linfocito T. (4).

En la actualidad una de las técnicas mas empleadas para la caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T, utiliza anticuerpos monoclonales contra la membrana.(5).

Estudios recientes señalan la participación de prostaglandinas y leucotrienos en la regulación de la respuesta inmune. Así como el que su precursor sea el ácido araquidónico, otras sustancias como las interleucinas parecen tener actividades mitogénicas citando al factor activador de leucocitos (LAF) y el factor estimulante de timocitos (TSF), entre otras, (6) y a las que también se considera responsables en los mecanismos de control y proliferación de las células T. (7):

## LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y LA RESPUESTA INMUNE

Factores ambientales, hereditarios, anóxicos, virales, parasitarios, bacterianos, la hiperlipidemia, la hipertensión, entre otros, son factores de riesgo que provocan la aterosclerosis y el infarto de miocardio y son los desencadenantes de las lesiones miocárdicas.

La participación de la respuesta inmune en los enfermos cardiovasculares, y los conocimientos recientes de su funcionamiento, estimularon el estudio que se describe en este trabajo sobre la relación entre el infarto de miocardio, el tabaquismo y los elementos de la respuesta inmune específica. El tabaquismo es un factor de riesgo coronario por los efectos tóxicos directos de sus componentes, las acciones farmacológicas de la nicotina, la existencia de sustancias como los polifenoles y alquitranes, a los que se relacionan con bronquitis, enfisema y cáncer, a pesar de que aún no están totalmente dilucidados los mecanismos.

El tabaco se utiliza para elaborar cigarrillos, puros, para pipas y para masticar. En la actualidad es notable el incremento del tabaquismo en nuestra sociedad, particularmente entre los adolescentes, lo que hace que un alto porcentaje de la población, desde temprana edad tengan contacto con el

tabaco o con el humo proveniente de su combustión. (8).

En los siguientes párrafos señalaremos de manera cronológica algunas relaciones entre tabaquismo y enfermedad.

Hace más de un siglo se sospechó que el tabaco podía ocasionar daño al organismo. Beau propuso que el tabaco podía ocasionar angina de pecho y fue Huchard en el libro "Traité Clinique des Maladies du Coeur et de L'aorte", tome II "Maladies des Coronaires et de L'aorte". Paris 1899. Donde expone algunas consideraciones sobre la relación entre el tabaquismo y la angina de pecho. (9).

De los resultados obtenidos en experimentos y estudios clínicos se proponen dos causas probables de la patología producida por el humo del tabaco: a) hipersensibilidad y b) irritación inespecífica. (10). Pero además hay que mencionar la posibilidad de que sea un efecto triple: farmacológico, alérgico e irritante local (11).

En el suero de sujetos fumadores se encuentran anticuerpos precipitantes contra antígenos del tabaco; parece ser que en ellos, son más frecuentes las enfermedades coronarianas, la frecuencia de estas enfermedades esta estrechamente ligada con el número de cigarrillos consumidos. (12).

Los principales hallazgos relacionados con el tabaquismo se pueden resumir en: la exposición a extractos de tabaco inhalados o inyectados, sensibilizan tanto al hombre como a los animales de experimentación. En el hombre la reacción se puede demostrar por pruebas dérmicas y serológicas y de animales sensibilizados se puede obtener un preparado cardiopulmonar y por la técnica de Langerdoff, mostrar una disminución del 39 al 78% en la fuerza de contracción, disminución del 18% en la frecuencia cardíaca y una disminución hasta del 65% en el flujo coronario, cuando se exponían los preparados cardiopulmonares a los extractos de tabaco, en comparación con los controles que tenían un flujo coronario del 79-110%, sin afectarse ni la frecuencia cardíaca, ni la fuerza de contracción del músculo cardíaco (13).

El análisis estadístico de autopsias, muestra que el cociente entre la muerte y la incidencia de enfermedades cardiovasculares es mayor en fumadores, que en los no fumadores y además independientemente del grado de tabaquismo, el porcentaje de pacientes con aterosclerosis coronariana, se incrementaba con la edad. (14).



Aunque se desconocen algunos de los mecanismos patogénicos de la bronquitis por el tabaquismo, se han observado alteraciones morfológicas y fisiológicas en el pulmón causadas por el humo del tabaco (15), por ello se asocia al tabaquismo y la bronquitis crónica con las infecciones bacterianas, sugiriéndose que el humo de tabaco contiene sustancias capaces de inhibir los mecanismos antibacterianos en el aparato respiratorio, a nivel de cilios, moco, tos y células, entre otras, y actuando primariamente sobre los macrófagos alveolares, interfiriendo con la actividad fagocítica, la adhesividad a la superficie del vidrio y posiblemente modificando el papel inmunoregulador de los macrófagos.

Las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la bronquitis y el enfisema, en ese orden, son algunos de los procesos patológicos que se presentan en los individuos fumadores. (16). Las alteraciones agudas y crónicas pueden favorecer la trombosis, debido a una mayor adhesividad plaquetaria provocada por las sustancias contenidas en los extractos de tabaco. Se ha propuesto un mecanismo en donde al bloquear los receptores adrenérgicos, se desarrolla un proceso alérgico al humo de tabaco en ratones (17).

Se ha aislado una glicoproteína de los extractos de tabaco a la cual se presentan reacciones dérmicas en el 40% de los

fumadores, y en el 37% de los no fumadores. Además esta glicoproteína fue identificada en el condensado de humo del tabaco. (18). Posteriormente se describen actividades relacionadas a esta glicoproteína.

Se han postulado algunos mecanismos que inducen daño vascular iniciando por la trombosis o que contribuyen a la atero -arterosclerosis o la participación conjunta de todos ellos. En conejos con trombocitopenia se probó que los antagonistas de la histamina eran capaces de evitar el depósito de complejos inmunes en las paredes de los vasos. Por otro lado, algunos productos derivados de la activación del complemento atraen leucocitos polimorfonucleares neutrófilos a los sitios de depósito de complejos inmunes y producen arteritis; además la liberación de los mediadores de la inflamación, a partir de las células cebadas e IgE, pueden provocar fenómenos anafilácticos en el corazón. (19).

La glicoproteína de tabaco puede activar la coagulación a través de la modificación del factor de Hageman, el proceso de la coagulación culmina con la conversión del fibrinógeno a fibrina por medio de la trombina (20). El sistema de coagulación tiene relación con productos activos del sistema inmune y del sistema de complemento. El sistema

de complemento esta compuesto por once proteínas en nueve fracciones y donde el objetivo es la eliminación del antígeno; una vez activado el sistema de complemento, se originan reacciones en cascada con las fracciones, con la siguiente secuencia: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. y en el camino se van liberando una serie de productos, como anafilotoxinas, productos quimiotácticos para células, entre otras, cuya función ha sido ya integrada a la respuesta inmune (21).

En apoyo de que los complejos circulantes son en parte los responsables del daño, se han determinado las precipitinas antitabaco en el suero de fumadores, siendo positivo el 11.8%; en pacientes con trastornos circulatorios y fumadores fueron positivos el 29.%; en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria y fumadores la positividad fue del 26%. En ningún caso se observaron precipitinas antitabaco en los sujetos no fumadores por la técnica de doble inmunodifusión. (9,22,23).

Se han demostrado anticuerpos de clase IgG, contra antígenos del tabaco por precipitación en agar, en el suero de conejos inmunizados y en el de humanos (24).

La glicoproteína del tabaco activaba al factor Hageman.  
(19, 25).

La electroforesis en gel de poliacrilamida del condensado de humo del tabaco reveló la presencia de material proteíco, desconociéndose sus propiedades fisicoquímicas (26).

Apoyando la hipótesis de que en las enfermedades cardiovasculares participa la respuesta inmune con anticuerpos de clase IgE, se tuvo anafilaxia cutánea pasiva en la piel de conejos sensibilizados previamente con suero y posteriormente inoculados con la glicoproteína del tabaco presente en el condensado de humo, este efecto se inhibió calentando el suero a 56°C por una hora, con lo cual se destruye la IgE (27).

La respuesta inmune contra eritrocitos de borrego se ha inhibido en ratones inyectados con extractos de humo del tabaco. En los ratones tratados, la función de las células T cooperadoras estuvo disminuida y se apreciaron alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias. (28).

En los fumadores asintomáticos se tiene una alteración en la fracción del carbohidrato de la IgG. Lo que puede deberse a la inhalación de productos del humo de tabaco.(29).

Al analizar los sueros de 47 fumadores, el 36% tuvieron reacciones dérmicas positivas contra los antígenos de tabaco y sus niveles séricos de IgA, IgE, IgG e IgM se elevaron en 4/47, 4/47, 7/47 y 10/47 respectivamente.(30).

El corazón es considerado como un órgano blanco de la anafilaxia y se puede producir choque anafiláctico en los corazones de conejos y cobayos que fueron inoculados previamente para inducirles la producción de anticuerpos de clase IgE. (31).

Se provocó colecistitis aguda, neumonitis y formación de trombos en los vasos pulmonares por la inyección de los productos contenidos en un condensado de humo de tabaco, los que pueden afectar al factor de Hageman.(25,32).

La concentración total de inmunoglobulinas, IgA e IgG, en el suero de sujetos que trabajaban en la industria del tabaco son mayores que en un grupo de sujetos que no laboran en fábricas para cigarrillos, sin embargo la IgM estaba disminuída en los fumadores con lo que se demuestra que la

inhalación de los componentes del tabaco pueden deprimir la respuesta inmune antitabaco; a pesar de la contradicción aparente en estos postulados, quizá el grado de exposición al tabaco, determinen una estimulación inicial y posteriormente una depresión de la respuesta inmune, además de considerar factores como los genéticos, entre otros que participan en la regulación de la respuesta inmune antitabaco. (33).

Estudiando efectos de la respuesta inmune celular contra tabaco, se ha visto que tanto en fumadores como en no fumadores, existe el mismo porcentaje de producción del factor inhibidor de la migración de leucocitos.(34).

La reactividad de los linfocitos "in vitro" a la fitohemaglutinina estaba aumentada en los fumadores y fue "normal" en los no fumadores. (35).

En la población linfocitaria de lavados bronquiales en sujetos sanos se tienen mas linfocitos T que B, lo cual difiere de la distribución que hay en sangre periférica. Se encontró un incremento en el número total de linfocitos T bronquiales en los fumadores comparativamente con los no fumadores. (36).

En sujetos fumadores estan incrementados los leucocitos debido probablemente al estímulo dado por los productos del tabaco. (37), sin embargo estos sujetos, con mayor cantidad de leucocitos y fibronectina, tienen una frecuencia mayor de infecciones respiratorias de tipo bacteriano, por lo que deben existir otros factores que contribuyen a la eliminación de bacterias. \*

La fibronectina es una glicoproteína de 210 Kd, cuya función esta estrechamente relacionada a la fagocitosis y destrucción de bacterias y que se produce por los macrófagos alveolares (38) y se ha encontrado una mayor producción de fibronectina por macrófagos alveolares de los sujetos fumadores con respecto a los macrófagos de individuos no fumadores (39).

Se encontró mayor número de macrófagos alveolares en los lavados bronquiales y los botones celulares fueron de color café en los sujetos fumadores, en los obtenidos de individuos no fumadores el número de macrófagos fue menor y el botón celular fue de color blanco. Los macrófagos provenientes de fumadores tienen cuerpos de inclusión con restos de alumina-silicato y se encontró disminuída la función bactericida de estas células (40).

Con la técnica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes poblaciones de linfocitos T, OKT3, OKT4 , OKT6 y OKT8, se encontró que la relación de linfocitos OKT4/OKT8, estaba disminuída en fumadores comparativamente con la de no fumadores o fumadores moderados. La disminución de la población de los linfocitos OKT4 corresponde a los linfocitos inductores y/o colaboradores y los OKT8 son citotóxicos y/o supresores. (41).

Se vió que los linfocitos OKT4 regresaban a los valores normales en sujetos que habían dejado de fumar durante 6 semanas, indicando que la alteración provocada por los productos del tabaco en la cantidad de los linfocitos OKT4 es un fenómeno reversible (42).

Aunque el tabaquismo es un factor de riesgo en el infarto del miocardio (22,23), aún no están dilucidados totalmente los mecanismos inmunopatológicos desencadenados por el tabaco o sus derivados. Se ha demostrado que los extractos salinos del tabaco y del condensado de humo de tabaco, son capaces de inducir una respuesta inmune y que en los extractos existe una glicoproteína a la cual se unen grupos químicos como la quercetina que activan al factor de Hageman y que inducen la producción de IgG o de IgE antitabaco,



que pueda provocar hipersensibilidad tipo I ó III, ó ambas, lo que apoyaría la relación entre el tabaquismo y las enfermedades tromboembólicas del pulmón y corazón.(43,44).

Con los antecedentes mencionados se propusieron los siguientes objetivos.

1. Caracterizar inmunoquímicamente el antígeno (S) contenido en extractos y condensado de humo del tabaco.
2. Determinar la presencia de anticuerpos antitabaco en sueros de individuos fumadores y no fumadores, sanos y con infarto de miocardio, tratando de establecer la relación con el infarto de miocardio.

MATERIAL Y METODOS.

## MATERIAL Y METODOS

Los compuestos utilizados fueron de grado reactivo analítico (Sigma, Merck, J.T. Baker, etc.) el tabaco se obtuvo de cigarrillos comerciales de las marcas: Baronet, Commander, Delicados, Del Prado, Fiesta, Marlboro, Marlboro lights, Raleigh y Salem. Los extractos y el condensado de humo de tabaco obtenidos con los cigarrillos delicados, fueron utilizados en el trabajo y con ellos se inmunizó a los conejos, como se describe después.

### EXTRACTO SALINO DE TABACO.

Se preparó de la siguiente manera: se colectaron 18 g de tabaco de los cigarrillos mencionados, y se molieron en licuadora, tratando de pulverizar el tabaco contenido y se extrajeron en una solución de P.B.S. pH 7.2 (página 36), por 18 horas a 4°C y agitación constante; una vez hecha la extracción, se filtra a través de gasa y el filtrado se centrifuga a 19,000 rpm por 30 min. a 4°C; terminada la centrifugación se descarta el botón y al sobrenadante, se le determina la concentración protéica. Para la preparación de extractos salinos con detergentes se sigue el mismo procedimiento que para el extracto salino, añadiéndole detergente al PBS a una concentración de 0.5%; los detergentes usados fueron:

dodecilsulfato de sodio (SDS), tritón-X-100 (TX100) y tween 20 (T20). A parte del extracto salino se le sonicó por 15 min. obteniendo el extracto salino sonicado.

#### CONDENSADO DEL HUMO DE TABACO.

Se obtuvo del humo de cigarrillos, que se condensa en P.B.S. y se le determina su concentración protéica como en los extractos anteriores. En el cuadro 1 se muestra el procedimiento para obtener el extracto salino.

#### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

Método de Lowry y Col. (45). todas las determinaciones se hicieron por la técnica referida y se leyeron en un espectrofotómetro Coleman Junior II A a 750 nm (soluciones y procedimiento en la pag 36).

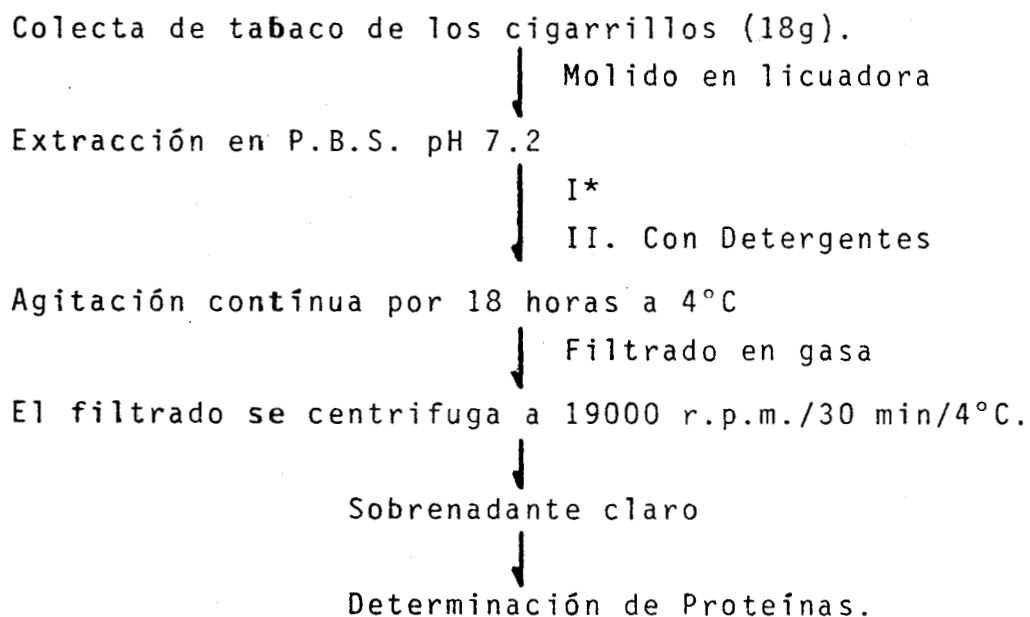
#### OBTENCIÓN DE SUEROS ANTIANTÍGENOS DE TABACO.

El esquema general de inmunización seguido fue el siguiente: el día uno se aplicaron 10 mg del extracto salino o del condensado de humo, homogenizados en adyuvante completo de Freund y por vía subcutánea en varios sitios del costado de los conejos. Los conejos utilizados eran albinos (new

CUADRO 1.

✓ OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SALINO.

---



\* Al extracto obtenido en

I. Se le denominó extracto salino

II. El P.B.S. contenía Detergentes al 0.5%, se le denominó:

Extracto salino con dodecilsulfato de sodio (E-SDS)

Extracto salino con Triton-x-100 (E-Tx-100)

Extracto salino con Tween 20. (E-T20).

zealand), de ambos sexos y con un peso promedio de 2.5Kg. a los 8 y 15 días siguientes se aplicaron 10 mg del antígeno, la correspondiente al día 15 se homogenizó con adyuvante incompleto de Freund. Al día 22 se aplicaron 10 mg del antígeno por vía intraperitoneal y al día 30 se sangró a los conejos, por la vena marginal de la oreja. Se dió dosis de refuerzo en los días 60 y 90 con 10 mg del antígeno por vía intraperitoneal, sangrando a los conejos 8 días después. La sangre se dejó coagular por 30 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min y se separó el suero. En el cuadro 2, se muestra el calendario de inmunización y sangrado.

#### PURIFICACIÓN DE GAMMAGLOBULINA.

Una vez obtenidos los sueros se purificó la gammaglobulina anti-antígenos del tabaco, siguiendo el método de precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación (46) como sigue:

*... basado en precipitación por sulfato*

1. Se ajustó la solución de sulfato de amonio a pH 7.8 con hidróxido de sodio 2N.
2. A 22.0 ml de los sueros, se agregaron lentamente y con agitación continua 22.0 ml de la solución saturada de

CUADRO 2.

INMUNIZACIÓN Y SANGRADO

---

DIA	OPERACION	SITIO
1	Aplicar 10mg con Antígeno con ACF*	Subcutánea
8	Aplicar 10mg de Antígeno	Subcutánea
15	Aplicar 10mg de Antígeno con AIF**	Subcutánea
22	Aplicar 10mg de Antígeno	Intraperitoneal
30	Sangrado	
60	Aplicar 10mg de Antígeno	Intraperitoneal
68	Sangrado	
90	Aplicar 10mg de Antígeno	Intraperitoneal
98	Sangrado	

---

\*Adyuvante completo de Freund

\*\*Adyuvante incompleto de Freund

El extracto salino y el condensado de humo de tabaco fueron usados como antígenos. Los conejos marcados con los números 393, 394 y 395 fueron inmunizados con el condensado de humo y los conejos con número 396, 397 y 398 con el extracto salino.

sulfato de amonio y se dejó una hora y a 20°C con agitación lenta.

3. Se centrifugó a 8000 rpm por 15 min a 20°C; los botones obtenidos se resuspendieron con 22.0 ml de la solución reguladora de salina-boratos pH 8.3 0.15M (pagina 36 ).
4. Se repitió 2 veces el proceso señalado en el punto 3 y el botón de la última centrifugación se disolvió en solución salina-borato, hasta alcanzar la tercera parte del volúmen inicial del antisuero (7 ml).
5. Las gammaglobulinas obtenidas, <sup>proteína de d... de...</sup> se dializaron contra la solución salina-borato a 4°C con agitación constante, haciendo cambios de la solución cuantas veces fue necesario, hasta eliminar los restos de sulfato, lo que se comprobó en un tubo de ensayo con la solución problema a la que se agregó cloruro de bario al 10% en ácido clorhídrico 0.5N.
6. Terminada la diálisis se centrifugó a <sup>2500</sup> 2500 rpm, 10 minutos a 4°C, para eliminar precipitados inespecíficos.



7. Se determinó la concentración protéica y se guardaron en alícuotas de 1.0 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las gammaglobulinas específicas.

#### MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN.

El principio de la prueba de difusión doble en agar se basa en que el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un medio semisólido, las bandas de precipitación que se observan, aparecen en la zona de equivalencia donde la concentración del antígeno y del anticuerpo son óptimas para la precipitación de cada sistema. Técnica de Wadsworth ligeramente modificado. (47).

1. Se preparó agar al 1% en P.B.S. pH 8.4 con 1mg/ml de azida de sodio.
2. Se montaron los moldes de lucita sobre los portaobjetos, en una mesa nivelada.
3. Se vaciaron 3.0 ml de agar sobre los portaobjetos y abajo de los moldes.
4. Se dejó gelificar a temperatura ambiente y se guardaron en cámara húmeda durante 18 horas y a  $4^{\circ}\text{C}$ .

5. Se extrajo el agar de los pozos por medio de vacío y se colocaron 50 ul del antígeno y anticuerpo respectivamente.
6. Se dejaron difundir a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 72 horas.
7. Se retiraron los moldes de lucita y las laminillas se dejaron lavando con S.S.B. a 4°C por 5 días, con 3 cambios de la solución
8. Se enjuagaron las laminillas con agua destilada durante 2 horas.
9. Se tiñeron con azul de coomassie durante 8 minutos (página 36).
10. Se decoloró y contrastó con una solución de metanol-acido acético-glicerol (página 36).
11. Se dejaron secar las laminillas en una estufa a 37°C durante 18 horas.
12. Se leyeron las laminillas en un negatoscopio.

### CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

El método implica la electroforesis en agarosa del antígeno y del anticuerpo en dirección opuesta y simultánea a partir de pozos separados, lo cual acelera la formación de las bandas de precipitación (2,48,49).

1. Se disolvió agarosa al 0.6% en solución reguladora de barbital y 1mg/ml de azida de sodio. (página 36).
2. Se colocaron 3 ml de agarosa sobre los portaobjetos.
3. Se dejaron enfriar 30 min. a temperatura ambiente y se guardaron en cámara húmeda a 4°C.
4. Se hicieron perforaciones de 2.5 mm de diámetro a 7 y 2 mm de distancia.
5. Se colocaron los antígenos y los anticuerpos usando como indicador de la movilidad electroforética a la albúmina con azul de bromofenol.
6. Se colocaron las laminillas en la cámara de electroforesis y se aplicaron 2.5 amperes de intensidad por laminilla.

7. La corrida se consideró terminada cuando el indicador se desplazó 20 mm.
8. Las laminillas se dejaron en cámara húmeda durante 48 horas a temperatura ambiente.
9. Se lavaron durante 5 días con S.S.B. haciendo 3 cambios de la solución.
10. Se lavaron con agua destilada durante 2 horas y se secaron a 37°C.
11. Se tiñeron con azul de coomassie y se contrastaron con la solución decolorante, se dejaron secar a 37°C durante 18 Hrs.
12. Se leyeron las laminillas en un negatoscopio.

#### ELECTROINMUNODIFUSIÓN.

El método implica la electroforesis del antígeno en gel de agarosa con el anticuerpo incorporado al gel y al encontrarse el antígeno y el anticuerpo en zona de equivalencia se forman picos de precipitación (50).

TECNICA.

1. Se preparó agarosa al 1.0% en solución reguladora de tris-barbital pH 8.6. (página 36).
2. Se incubó el anticuerpo a 56°C por 15 segundos y se mezcló con la agarosa, a la misma temperatura quedando a una concentración final de 2.5%.
3. Se colocaron 4ml de la mezcla por portaobjeto.
4. Se colocaron las placas en la cámara de electroforesis y se depositó el antígeno en los pozos. Las diluciones del antígeno se hicieron con solución salina esteril.
5. La muestra se corrió a 10 amperes por laminilla durante 4 horas.
6. Se dejaron incubar las laminillas durante 48 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
7. Se lavaron con S.S.B. durante 72 horas a 4°C con 2 cambios diarios de la solución.

8. Se dejaron secar durante 18 horas a 37°C.
9. Se tiñeron con azul de coomassie y se contrastaron con solución decolorante, se dejaron secar y se leyeron en un negatoscopio.

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Es un método que permite separar las subunidades de una proteína y determinar los pesos moleculares. La separación de las cadenas polipeptídicas y su solubilización es provocada por dodecilsulfato de sodio y betamercaptoetanol.(51) La técnica es la siguiente:

##### I. PREPARACION DE GELES.

1. Se preparó la siguiente mezcla con agitación constante a temperatura ambiente: fosfato de sodio 0.2M-SDS 0.2% pH7, 12.5ml; acrilamida al 40%, 4.69 ml; bisacrilamida al 2°, 2.54 ml; agua destilada 4.0 ml; persulfato de amonio (5mg/ml), 1.25 ml; y tetrametiletildiamino 0.03 ml.

2. Se llenaron los tubos de vidrio a un mismo nivel con pipeta Pasteur, se cubrieron con agua destilada y se dejaron a 20°C durante 24 horas.

## II PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

A 90 ul de muestra con una concentración de 6mg/ml de proteína, se agregaron 10 ul de la solución A (página 36), se incubó 15 min a 60°C y se añadieron 70 ul de la solución B (página 36), se agitaron y dejaron durante 18Hs a 4°C.

## III ELECTROFORESIS.

1. Se extrajo el agua del extremo superior de los tubos.
2. Se colocaron 50 ul de muestra.
3. Se rellenó cada tubo con la solución reguladora de fosfato de sodio 0.1M-SDS 0.1% pH 7.
4. Se colocaron los tubos en la cámara de electroforesis aplicándose 4 amperes por tubo hasta que la muestra pasó al extremo superior del gel, y después se aplicaron 8 amperes por tubo.

001009

5. Se consideró terminada la electroforesis cuando el col  
rante indicador llegó al extremo inferior del tubo.
6. Se quitaron los tubos de la cámara y se les extrajo el  
Gel.
7. Se tiñeron con solución colorante de azul de coomassie  
y se contrastaron con una solución de ácido acético-  
metanol al 5% en agua destilada.
8. Se leyeron los geles en un negatoscopio.

#### HEMAGLUTINACIÓN PASIVA.

#### GLUTARALDEHIZACION DE LOS ERITROCITOS (52).

1. Se lavaron los eritrocitos de borrego y humanos con PBS  
pH 8 por triplicado.
2. A 0.25 ml de eritrocitos se añadieron 16.0 ml de PBS  
pH8 y 0.5 ml de glutaraldehido al 2% en PBS. y se agita-  
ron durante una hora a temperatura ambiente.



3. Se centrifugó y lavó con PBS por duplicado.
4. Se agregaron 10.0 ml de Glicil-Glicina 0.35% en PBS y se agitó una hora a temperatura ambiente.
5. Se conservaron a 4°C.
6. Se resuspendieron en 25 ml de una solución de Gelatina-Barbiturato-Veronal (GBV) (pág 36) con una dilución 1:5 y se probaron los extractos de solanáceas. tabaco, papa y jitomate (*Nicotiana tabacum*, *Solanum* (S). *tuberosum* y *Lycopersicum sculentum*). (69).

#### DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS DE SOLANACEAS.

1. Se tomaron 2.0 ml de eritrocitos humanos A,B,AB y 0 Rh positivo y 2.0 ml de eritrocitos de borrego.
2. Con GVB 1:5 se lavaron los eritrocitos 3 veces, centrifugando a 2500 r.p.m. 10 min.
3. Se ajustaron los eritrocitos a una concentración 1%
4. A cada pozo de las placas de hemaglutinación en V se le

agregaron 25 ul de los extractos, a diferente concentra  
ción (entero, 1:2, 1:4, etc).

5. Se añadieron 25 ul de los eritrocitos al 1.0% y se cubrió la placa con parafilm.
6. Se incubó la placa a 37°C durante una hora, con agitación continua.
7. Se guardaron las placas a 4°C, 24 horas y se leyeron anotando los títulos.

#### CROMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-100 (53).

1. Se hidrató sephadex G-100, en solución salina de boratos.
2. Se colocó en una columna de 100 X 2.4 cm.
3. Se lavó la columna con 800 ml de SSB.
4. Se agregó el extracto en una concentración de 100mg/6 ml. a los que se añadieron 3.0 ml de glicerol. Una vez que entró toda la muestra se agregó SSB.

5. Se colectaron 5 ml por tubo y terminada la cromatografía se leyó el contenido protéico en un espectrofotómetro PMQ 3 Zeiss. A 280 nm y se graficaron los resultados.

*50/1/10*  
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (54) DEAE-CELULOSA. *0.5 hrs*

1. Se lavó con HCL 0.5 N 30 min. y después con NaOH 0.5 N 30 min y este se repitió hasta que el filtrado tuviese un pH cercano a 7.

DEAE-Celulosa, se dejó equilibrar en una solución reguladora de fosfatos 0.1M pH 8, 18 horas.

2. Se empacó en una columna de 40 X 2.5 cm y se lavó con la solución de fosfatos 18 hrs.
3. Se colocaron 5 ml de la muestra en la columna, y se eluyó con la misma solución.
4. Se hizo una segunda elución con una solución de fosfatos 0.1M, NaCL3M pH 5.7.
5. Otra elución se hizo con una solución de fosfatos 0.1M, NaCL 3M pH 5.0

6. Se leyó la concentración proteica y se graficaron resultados.

CM-CELULOSA.

1. Se lavó en NaOH 0.5N y después en HCL 0.5N se dejó equilibrar CM-Celulosa en una solución que contiene fosfatos 0.1M pH5. 18 horas.
2. Se empacó una columna de 40X2.5 cm y se lavó 18 horas
3. 5 ml de la muestra se eluyeron en la misma solución.
4. Una segunda elución se hizo con fosfatos 0.1M NaCl 3M, pH 5.7.
5. Una tercera elución se hizo con fosfatos 0.1M, NaCl 3M pH 8.0.
6. Se leyó la concentración proteica y se graficaron resultados.

\* SUEROS HUMANOS.

Los sueros humanos de individuos sanos, pacientes con infarto de miocardio, fiebre reumática y donadores de sangre se obtuvieron de los Laboratorios Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

El diagnóstico de cada enfermedad se hizo en base al cuadro clínico, pruebas de laboratorio y de gabinete.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

SOLUCIÓN SALINA-FOSFATOS pH 7.2, 0.15 M.

1. Cloruro de Sodio 7.88g en 1800 ml de agua destilada.
2. Fosfato de sodio dibásico anhidro 2.12g en 200 ml agua destilada.
3. Fosfato de Sodio Monobásico 0.52 en 50 ml de agua destilada.
4. Se mezclan la solución 1 y 2 y se ajusta el pH a 7.2 con la solución 3.

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

### Solución A:

0.1ml de Tartrato de Sodio al 2%.

0.1ml de Sulfato de Cobre al 1%.

10.0ml de Carbonato de Sodio al 2% en Hidroxido de Sodio 0.1N

### Solución B:

1.0ml Reactivo Fenol(Folin-Ciocalteu)

1.0ml agua destilada.

La curva patrón se hizo con albúmina sérica bovina en diluciones conteniendo 220, 110, 55, 27.5, 13.75 y 6.8 mg/0.1 ml de proteína.

Procedimiento: A 0.1ml de muestra y diluciones de la curva se agregaron 2.0ml de solución A, se agitaron y se dejaron por 10min. se añadieron 0.2ml de solución B, se agitaron y se dejaron por 30 min.

### SOLUCIÓN REGULADORA DE SALINA-BORATOS 0.15M PH 8.3.

Acido Bórico	6.184g
Borato de Sodio Decahidratado	9.536g
Cloruro de Sodio	4.384g
Agua Destilada c.b.p.	1000ml

Para ajustar a pH 8.3 se usó HCL ó NaOH IN.

Esta solución se combina con 19 litros de Cloruro de Sodio al 0.15M.

### AZUL DE COOMASSIE.

Azul brillante de Coomassie R-250	2.5g
Agua Destilada	454ml
Metanol	454ml
Acido Acetico	9.2ml

### SOLUCIÓN DECOLORANTE.

Acido Acético GL.	50ml
Metanol	50ml
Glicerol	10ml
Agua Destilada c.b.p.	1000ml

### SOLUCIÓN REGULADORA DE BARBITAL 0.02M PH8.6.

Barbital Sodico	18g
Azida de Sodio	2g
HCL 1N	13ml
Agua Desionizada c.b.p.	2000ml.

### SOLUCIÓN REGULADORA TRIS-BARBITAL PH8.6 0.02 M.

Tris-Base	27.7g
Acido Barbitúrico	7.6g
EDTA Disódico	1.8g
Azida de Sodio	1.0g

Se adicionaron 800ml agua destilada, se ajustó el pH a 8.6 y se aforó a un litro.

### SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Procesamiento de la muestra.

#### Solución A

Fosfato de Sodio 0.1M pH7	80ml
SDS al 10%	10ml
Betamercaptoetanol al 10%	10ml

#### Solución B

Fosfato de Sodio 0.2M-SDS 0.2%	5ml
--------------------------------	-----



Betamercaptoetanol 10%	0.5ml
Azul de Bromofenol	5mg
Glicerol	5ml.

### SOLUCIÓN REGULADORA DE GELATINA-BARBITURATO-VERONAL (G.V.B.)

Solución 1. 85g NaCL; 3.25g Dietilbarbiturato de Sodio; se agregan 1,400ml de agua destilada.

Solución 2. 5.72g Acido Dietilbarbitúrico en 500ml de agua destilada.

Se combinan la solución 1 y 2, y se añade 2g de gelatina para quedar a una concentración de 0.1%; se añade 5ml de cloruro de Calcio 0.3M y 5ml de Cloruro de Magnesio 1.0M. y se afora a 2000 ml con agua destilada.

GVB ++

Como el anterior, solo que en lugar de 5 ml son 10ml los de Cloruro de Calcio y Magnesio utilizados.

El G.V.B. utilizado para sensibilizar, no lleva Cloruro de Calcio, ni Cloruro de Magnesio.

RESULTADOS.

001000

## RESULTADOS

### LA CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LOS EXTRACTOS Y EL CONDENSADO DE HUMO DEL TABACO.

Los extractos de tabaco utilizados tuvieron una concentración protéica, muy similar, los extractos salinos ~~y~~ sonificados, y con tween 20 dieron 3.0mg/ml; el extracto salino con dodecilsulfato de sodio y con triton-X-100 dieron 3.2 y 3.3 mg/ml respectivamente. El condensado de humo de tabaco tuvo 2.2mg/ml. en la tabla I, se muestran los resultados.

### CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS GAMMAGLOBULINAS ANTITABACO.

Las gammaglobulinas obtenidas del primer sangrado de los conejos inmunizados con el condensado de humo números 393, 394 y 395 dieron una concentración de proteínas que variaba de 23.5 hasta 37.4 mg/ml, con un promedio de 30.45. Los conejos marcados con los números 396, 397 y 398, que fueron inmunizados con el extracto salino, tuvieron anticuerpos con una concentración de proteínas que varió de 48.0 hasta 64.0 mg/ml, con un promedio de 56.0. A los 30 días del primer sangrado, se obtuvieron gammaglobulinas de los conejos, 394, 395, 396 y 398 con una concentración protéica de 35.0, 36.0, 65 y 48.0 mg/ml respectivamente, Los resultados se muestran

TABLA I.

CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LOS EXTRACTOS DE TABACO Y  
DEL CONDENSADO DE HUMO DEL TABACO.

---

<u>E X T R A C T O</u>	<u>CONCENTRACION PROTEICA (mg/ml)</u>
ES*	3.0
ESDS	3.2
ETX-100	3.3
ET 20	3.0
ESS	3.0
CH	2.2

---

\*Ver tabla de abreviaturas (pág.VI i)

\*\*Determinación por el método Lowry y Col. (45).

en la tabla II.

#### CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTISUEROS ANTITABACO.

En las tablas III y IV se muestran los resultados al enfrentar los anticuerpos obtenidos contra el extracto salino y el condensado de humo, con los antígenos del tabaco por las técnicas de microdobleinmunodifusión (Tabla III) y de contrainmunolectroforesis (Tabla IV).

En la microdobleinmunodifusión, se probaron el suero total y las gammaglobulinas purificadas, en general no hubo reacción cuando se enfrentaron a los extractos salino y sonificado y al condensado de humo. En comparación con estos resultados si hubo bandas de precipitación cuando se enfrentaron con los extractos salinos con detergentes. La figura A muestra lo señalado.

Por contrainmunolectroforesis el reconocimiento de los anticuerpos antitabaco con los diversos extractos del tabaco, fue más notable, mostrando una baja reactividad cuando se enfrentaban al condensado de humo. En algunos sistemas antígeno-anticuerpo se llegaron a determinar hasta 3 bandas de precipitación, el extracto salino con, dodecilsulfato de sodio, dió el mismo promedio de bandas de precipitación

TABLA II.

CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LAS GAMMAGLOBULINAS ANTITABACO.

---

<u>GAMMAGLOBULINAS</u>	<u>CONCENTRACION (mg/ml)**</u>	
393	23.5	-
394	32.0	35.0 <sup>+</sup>
395	37.4	36.0
396	64.0	65.0
397	48.0	-
398	55.0	48.0

---

<sup>+</sup>Las lecturas corresponden a sangrados hechos con un mes de diferencia.

Los conejos 393,394 y 395 fueron inmunizados con el condensado de humo.

Los conejos 396,397 y 398 fueron inmunizados con el extracto salino.

Los conejos 393 y 397 murieron después del primer sangrado.

\*\* Determinación por el método de Lowry y Col.

TABLA III.

MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS  
DEL TABACO.

---

<u>SUERO TOTAL</u>	<u>ANTIGENOS</u>					
	ES*	ESS	ESDS	ETXI00	ET20	CH
GRUPO I	0.0**	0.0	1.4	1.75	1.4	0.0
GRUPO II	0.0	0.08	0.6	1.4	1.3	0.0
<u>GAMMAGLOBULINAS***</u>						
GRUPO I	0.0	0.0	0.95	0.47	0.75	0.0
GRUPO II	0.0	0.0	1.0	0.6	0.3	0.0

---

\* Ver tabla de abreviaturas

\*\* Promedio de bandas de precipitación, del suero en 10 pruebas.

Grupo I conejos.inmunización con el condensado de humo.

Grupo II conejos.inmunización con el extracto salino.

\*\*\* Concentración referida en la tabla II

TABLA IV.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS.  
DEL TABACO.

---

	<u>ANTIGENOS</u>					
<u>SUERO TOTAL</u>	ES*	ESS	ESDS	ETX100	ET20	CH
GRUPO I	1.6**	1.0	1.1	0.85	0.6	0.0
GRUPO II	1.2	1.0	1.1	0.3	1.6	0.6
<u>GAMMAGLOBULINAS***</u>						
GRUPO I	0.5	1.0	1.1	0.8	1.1	0.4
GRUPO II	1.1	1.5	1.1	1.25	1.3	1.0

---

\* Ver tabla de abreviaturas.

\*\* Promedio de bandas de precipitación en 10 pruebas.

\*\*\* Concentración referida en la tabla II.

Grupo I conejos inmunizados con el condensado de humo.

Grupo II conejos inmunizados con el extracto salino.



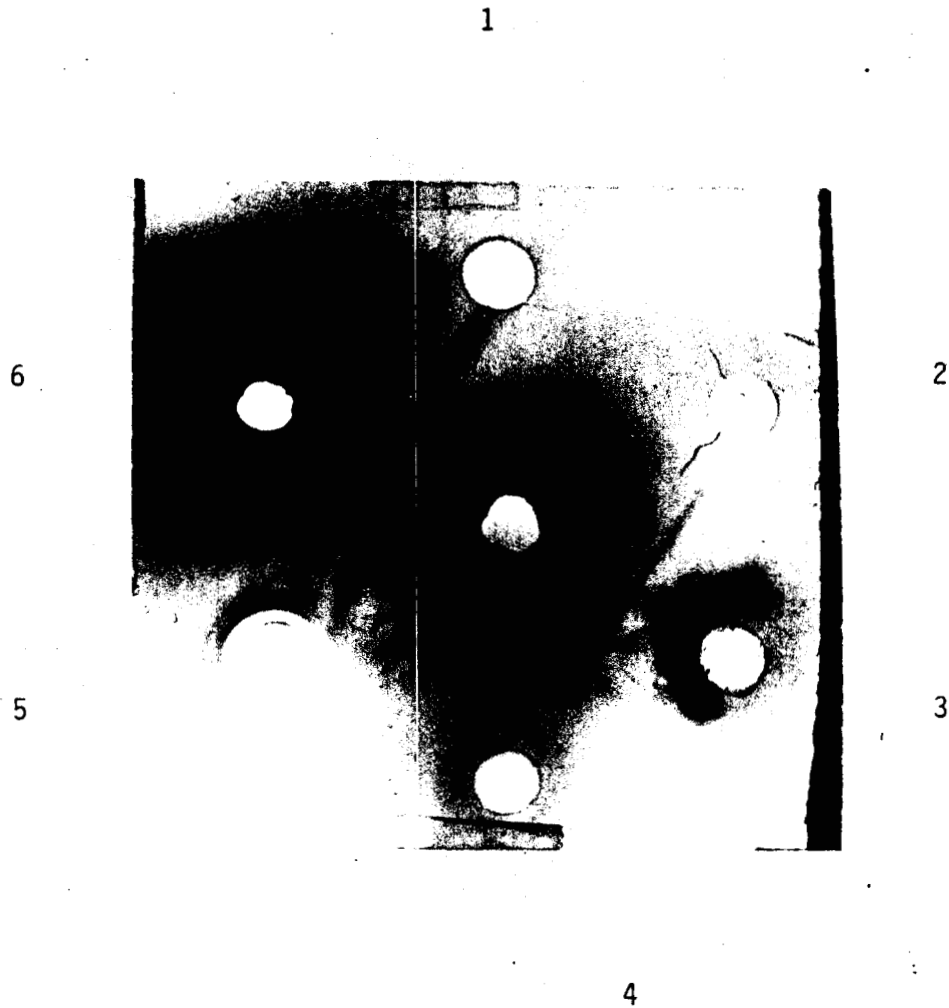


Figura A. Se muestra una microdobleinmunodifusión de los anticuerpos antiextracto salino de tabaco (pozo central)  
Contra: 1.extracto salino; 2.extracto salino sonificado;  
3. Extracto con SDS; 4. Extracto con triton X 100;  
5. Extracto con tween 20 y 6. Gamma-globulina de perro.

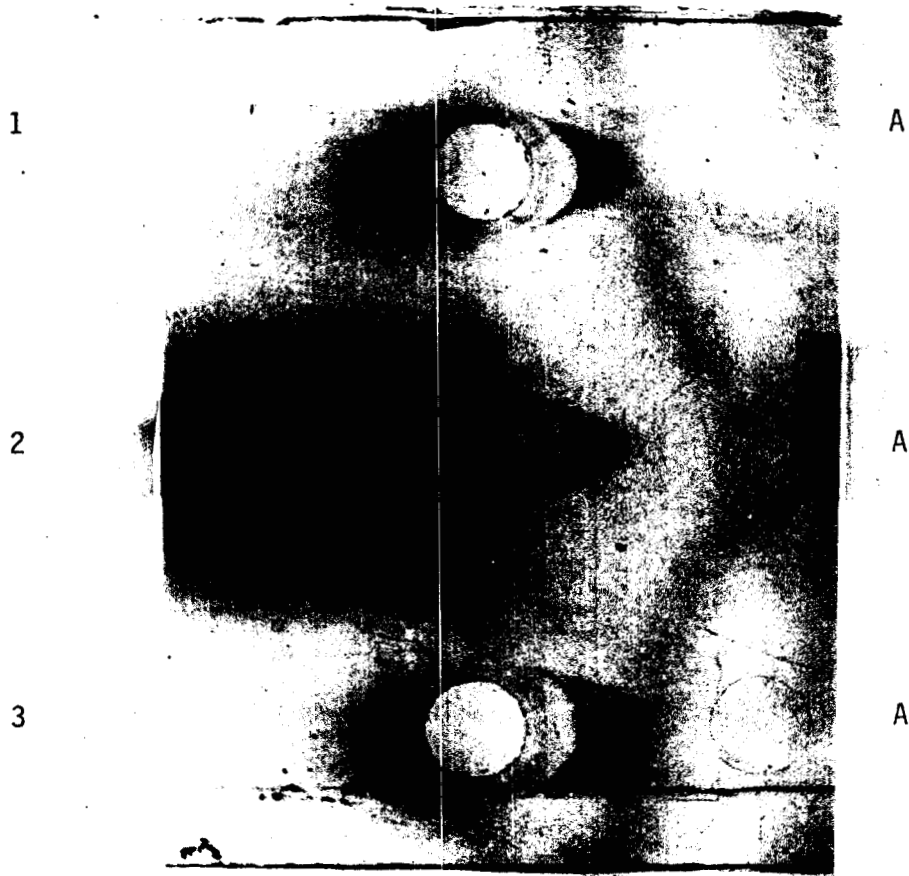


Figura B. Se muestra una contra<sup>u</sup>inmuno<sup>u</sup>electroforesis del anticuerpo antiextracto salino de tabaco (pozos A) contra:

1. Extracto con SDS; 2. Extracto triton X 100
- y 3. Extracto con tween 20.

cuando se enfrentó al antisuero y a las gammaglobulinas en la figura B, se muestra lo arriba indicado.

#### ELECTROINMUNODIFUSIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS DE TABACO.

Con esta técnica, se obtuvieron picos de precipitación cuya altura varió de uno a 14 mm. con el anticuerpo antiextracto salino entero y diluído hasta 1:8 con 25ug/ml de extracto salino de tabaco, no se observaron picos con el anticuerpo anticondensado de humo. En la tabla V se muestran los resultados y en la figura C se muestran resultados obtenidos por esta técnica.

#### ANTICUERPOS ANTITABACO EN PACIENTES CARDIÓPATAS POR MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN.

Se tomaron 90 sueros y se enfrentaron a los extractos de tabaco y al condensado de humo. Los sueros provenían de pacientes con padecimientos tales como fiebre reumática, lupus eritematoso y glomerulonefritis entre otros (Tabla VIII). Los sueros mostraron una baja frecuencia de reactividad contra el extracto salino, mientras que contra los extractos con detergente dieron una mayor frecuencia de reactividad, lo que se traduce en un alto porcentaje de po

TABLA V.

ELECTROINMUNODIFUSIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DEL  
TABACO.

---

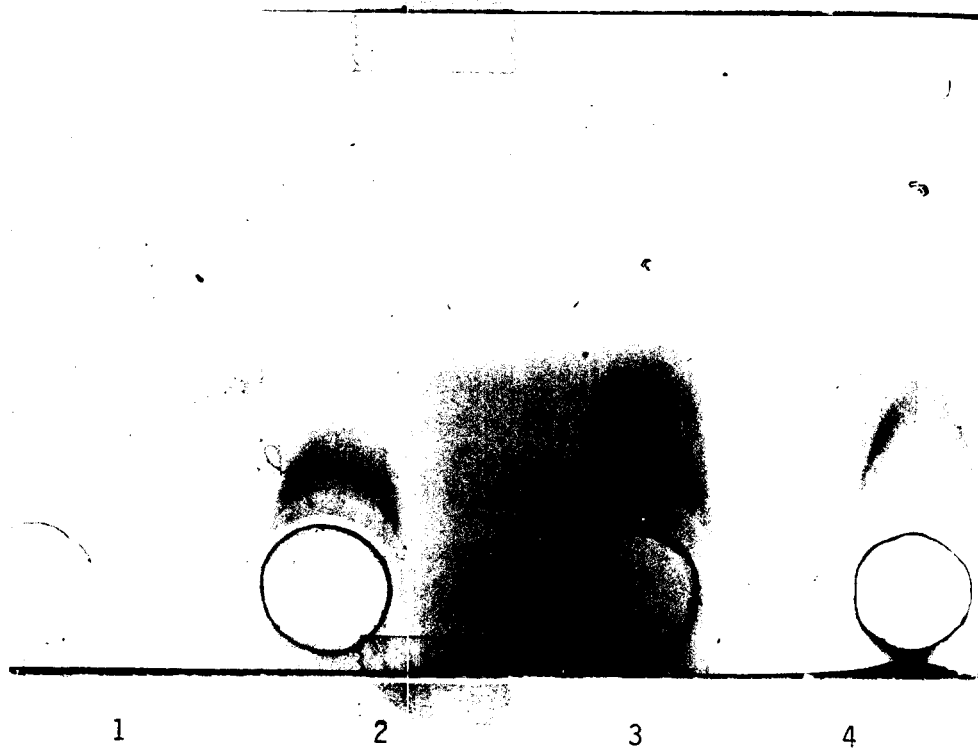
	<u>ANTIGENO</u>			
	ES*	1:2	1:4	1:8
<u>GAMMAGLOBULINAS</u>				
396**	14***	12	6	2
398	12	9	5	1

---

\* Extracto salino

\*\* 25ug/ml de Proteínas.

\*\*\* Milímetros de altura de los picos.



001009

Figura C. Se muestra una electroinmunodifusión de anticuerpo antiextracto salino de tabaco. Contra el extracto salino. En los pozos 1,2,3 y 4 se colocaron los antígenos diluidos 1:8, 1:4 y 1:2 y entero respectivamente.

sitividad cuando se probaron con la técnica de microdobleinmunodifusión. Los sueros que se enfrentaron al condensado de humo tuvieron baja positividad. La tabla VI muestra los datos mencionados.

#### ANTICUERPOS ANTITABACO EN PACIENTES CARDIOPATAS POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Los porcentajes de positividad cuando se enfrentaron los sueros contra los extractos del tabaco tratados con detergentes, fueron mayores, inclusive se halla un 94% con el extracto salino con dodecilsulfato de sodio. Con el extracto salino el porcentaje obtenido, fue muy similar al obtenido con la técnica de microdobleinmunodifusión y fue negativo contra el condensado de humo. Los resultados se muestran en la tabla VII. Con los datos obtenidos, se determinó el porcentaje de positividad de anticuerpos antitabaco en el suero de 111 sujetos, que habían aprobado un examen clínico de salud, y cuyas características se muestran en la tabla VIII. De los 111, 75 eran fumadores y 36 no fumaban. Por microdobleinmunodifusión hubo bajos porcentajes de positividad cuando se enfrentaron los sueros de los fumadores con el extracto salino, extracto con dodecilsulfato y el condensado de humo. Por contrainmunolectroforesis solo con el condensado de humo se obtuvo un bajo porcentaje de positiv

TABLA VI.

ANTICUERPOS ANTITABACO EN PACIENTES CARDIÓPATAS\* POR  
MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN.

---

<u>EXTRACTO</u>	<u>FRECUENCIA</u>	<u>% POSITIVIDAD</u>	<u>PROMEDIO DE BANDAS</u>
ES**	6/90	6.4	1.0
ESDS	50/90	55.5	1.0
ETX100	57/90	63.3	1.1
ET20	32/90	35.5	1.0
CH	0/90	0.0	0.0

---

\* El grupo incluye a pacientes con fiebre reumática, lupus, infarto del miocardio, miocarditis, entre otros.

\*\* Ver tabla de abreviaturas.

TABLA VII.

ANTICUERPOS ANTITABACO EN PACIENTES CARDIÓPATAS POR  
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

<u>EXTRACTO</u>	<u>FRECUENCIA</u>	<u>PORCENTAJE DE POSITIVIDAD</u>	<u>PROMEDIO DE BANDAS</u>
ES*	3/90	3.33	1.0
ESDS	85/90	94.4	1.7
ETX100	57/90	63.3	1.9
ET20	53/72	58.8	1.7
CH	0/72	0.0	0.0

---

\* Ver tabla de abreviaturas.

En este grupo se incluyen pacientes con fiebre reumática, lupus, infarto del miocardio, entre otros.



TABLA VIII.

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

	<u>TOTAL</u>	<u>SEXO%</u>		<u>% FUMADORES</u>	<u>EDAD</u>
		F	M		
INDIVIDUOS SANOS**	111	10	90	67	31.8*
CARDIOPATAS***	90	40	60	57	38.8
INFARTADOS****	54	31	69	70	58.6

\* Edad Promedio

\*\* Sujetos que aprobaron un examen de salud

\*\*\*\*Sujetos con infarto agudo del miocardio

\*\*\*Grupo de individuos.

19 Sujetos con fiebre reumática

52 Sujetos sanos, en los que se sospechó una cardiopatía

3 Sujetos con lupus

7 Sujetos con miocarditis

5 Sujetos con soplo

1 Sujeto con valvulopatía

3 Sujetos sin diagnóstico.

dad. Los demás extractos dieron altos porcentajes de positividad especialmente con los extractos tratados con detergentes. Los resultados se muestran en la tabla IX.

En la tabla X se muestran los resultados de los 36 individuos que no fuman y es notable la diferencia encontrada entre los porcentajes de positividad por la técnica de microdobleinmunodifusión y de la contraimmunoelectroforesis.

Así, en la primera, hubo un 27 y 41% para el extracto salino tratado con tritón-X-100 y tween 20, por la contraimmunoelectroforesis hubo un 57, 75 y 77% para los extractos con tween 20, triton X 100 y dodecilsulfato de sodio respectivamente.

En 54 pacientes con infarto agudo del miocardio cuyas características se aprecian en la tabla VIII, se encontró 31.5 y 23.6 de porcentaje de positividad con el extracto salino y con el extracto con dodecilsulfato de sodio. Por la técnica de microdobleinmunodifusión y se obtuvo 73.6 y 94.7 respectivamente por contraimmunoelectroforesis en 38 pacientes fumadores. El resto que no fumaban, hubo 18.7 y 31.2% para el extracto salino y el extracto con dodecilsulfato sodico por microdobleinmunodifusión y 93.7 y 68.7 respectivamente por contraimmunoelectroforesis. Los resultados se muestran en las tablas XI y XII.

TABLA IX.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN 75 SUJETOS FUMADORES POR  
MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

EXTRACTO	MID	CIEF
ES*	4	54
ESDS	4	81
ETX100	44	80
ET20	46	53
CH	0	13

---

\* Ver tabla de abreviaturas

MID: Microdobleinmunodifusión

CIEF: Contrainmunolectroforesis

TABLA X.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN 36 SUJETOS NO FUMADORES POR  
MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

EXTRACTO	MID	CIEF
ES*	0	72
ESDS	0	77
ETX100	27	75
ET20	41	58
CH	0	2.7

---

\* Ver tabla de abreviaturas

MID: Microdobleinmunodifusión

CIEF: Contrainmunolectroforesis

TABLA XI.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN 38 INDIVIDUOS CON INFARTO DE  
MIOCARDIO Y FUMADORES POR MICRODOBLEIMNUNODIFUSIÓN Y  
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

EXTRACTO	MID	CIEF
ES*	31.5	73.6
ESDS	23.6	94.7

---

\* Ver tabla de abreviaturas

MID Microdobleinmunodifusión

CIEF Contrainmunolectroforesis.

TABLA XII.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN 16 INDIVIDUOS CON INFARTO DE  
MIOCARDIO (NO FUMADORES) POR MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN Y  
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

EXTRACTO	MID	CIEF
ES*	31.2	68.7
ESDS	18.7	93.7

---

\* Ver tabla abreviaturas

MID Microdobleinmunodifusión

CIEF Contrainmunolectroforesis

001009

## CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX-G-100 DE LOS EXTRACTOS SALINOS Y EL CONDENSADO DE HUMO.

Las figuras 1,2,3 y 4 muestran los perfiles obtenidos al pasar el condensado de humo, el extracto salino, el extracto con triton-X-100 y con dodecilsulfato de sodio, por una columna de sephadex G-100, con una concentración aproximada de 100mg en 6ml. Se usaron proteínas como albumina sérica bovina, y citocromo C, y además al dextran como patrones de peso molecular. El condensado de humo dió un pico de 67 KD aproximadamente, al leerse las fracciones a 280nm. El perfil se muestra en la figura 1. El extracto salino y el extracto con triton-X-100 dieron 3 picos, de los cuales el primero tenía como 200,000 D y para el extracto salino los dos restantes mostraron pesos de 10000 ó menos y para el extracto con tritón X-100, abarcaron pesos de 10 a 70 KD. Las figuras 2 y 3 muestran los perfiles. La fig. 4. muestra el perfil del extracto con SDS, notando 4 picos, uno de 200,000 y los demás con pesos moleculares menores a 60 KD.

## CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO SALINO EN DEAE-CELULOSA.

En este intercambiador, El extracto salino de tabaco dió 4 fracciones, de los cuales solo el I y el II dieron bandas de precipitación cuando se enfrentaron a los anticuerpos an

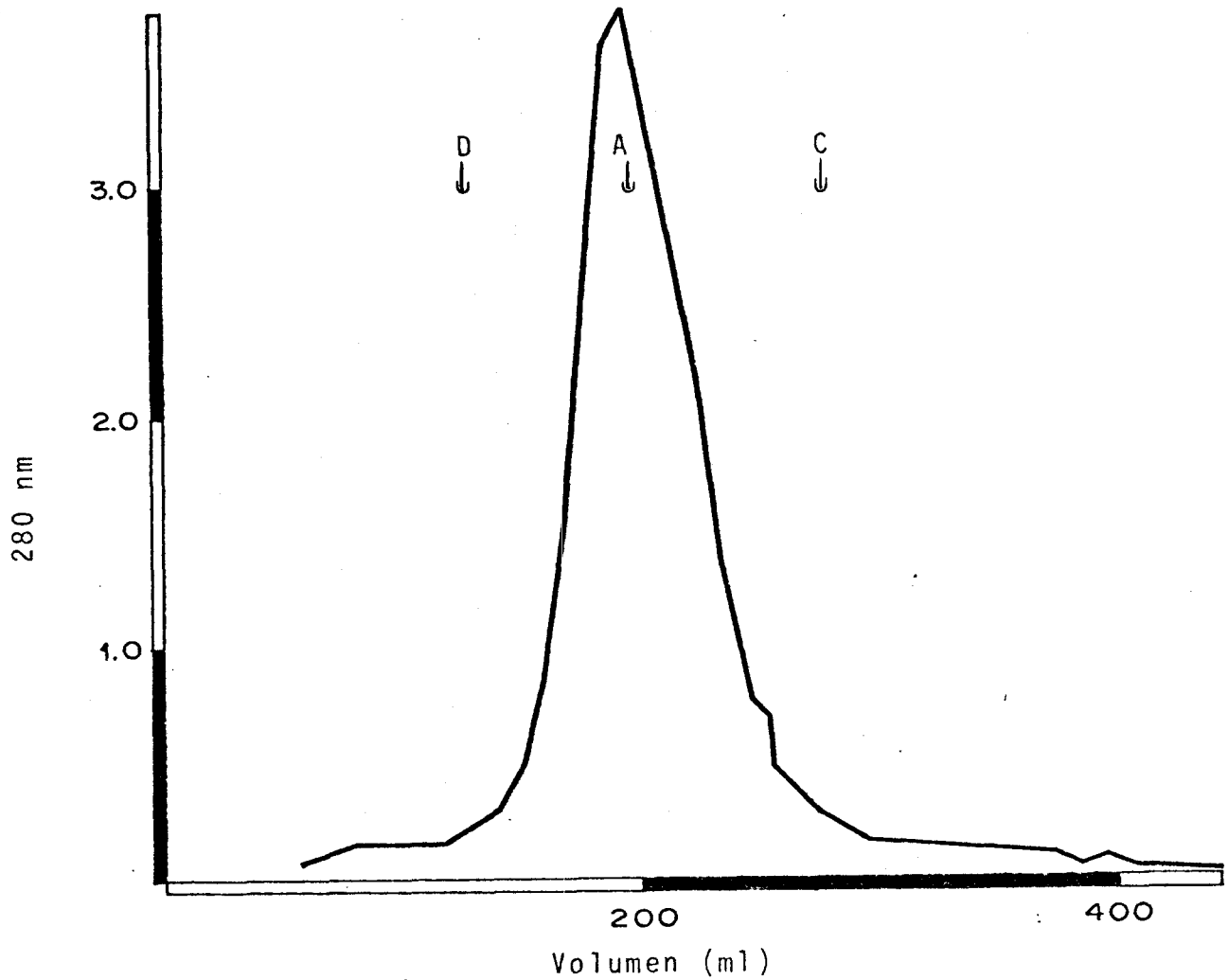


Figura 1. Cromatografía del condensado de humo de tabaco en Sephadex-G-100.

Se muestra un pico de peso de 67000 Aprox.  
Las marcas corresponden a patrones de peso molecular Dextran Azul (200,000) albúmina sérica Bovina (67,000) Citocromo C (12500). El volumen vacío fue de 110 ml.



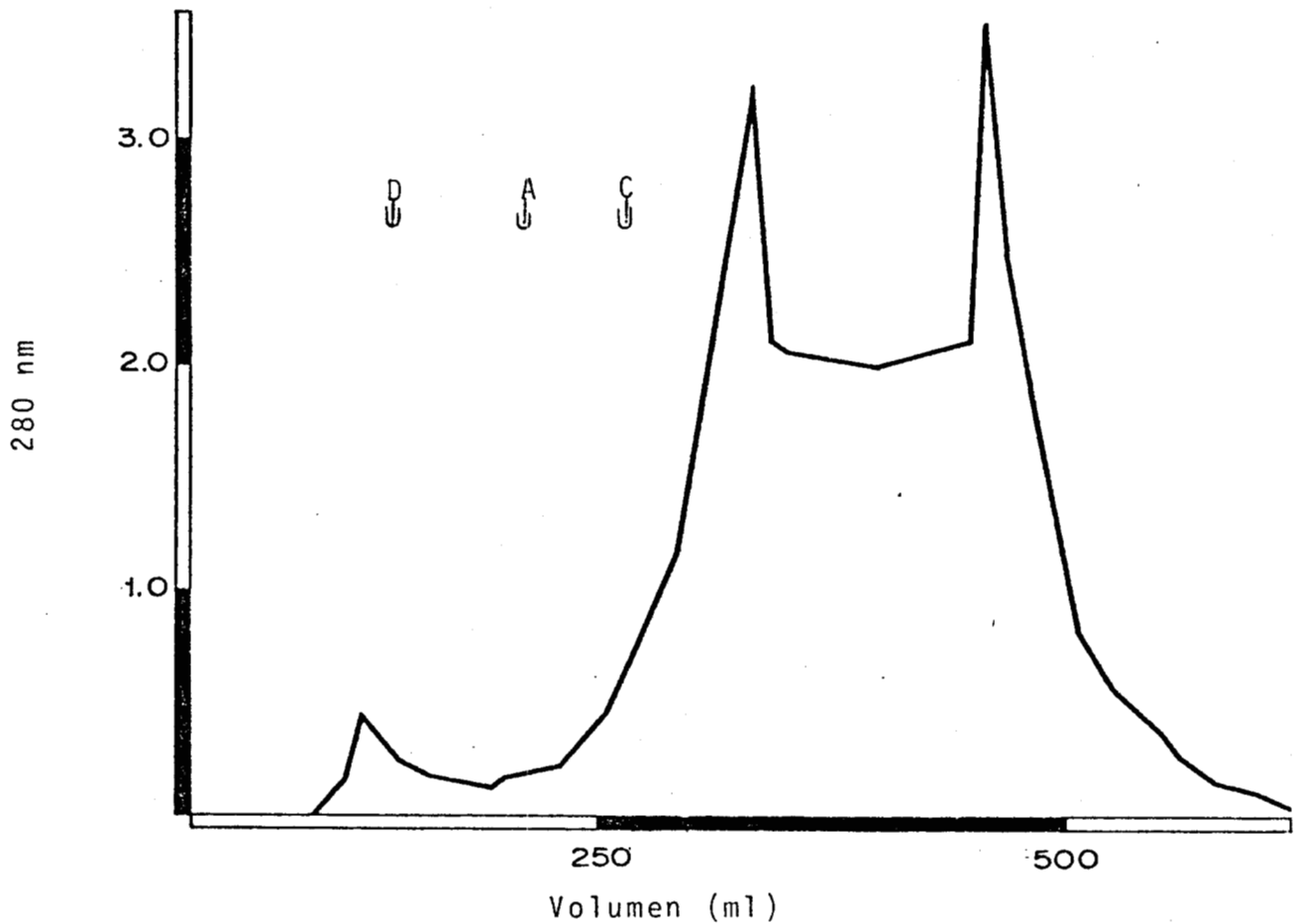


Figura 2. Cromatografía del extracto salino de tabaco en Sephadex-G-100. Se muestran 3 picos, uno mayor de 200,000 D, 2 menores de 10,000. Las marcas corresponden a los patrones de referencia. Dextran azul, albúmina sérica bovina y citocromo C. El volumen vacío fue de 100 ml.

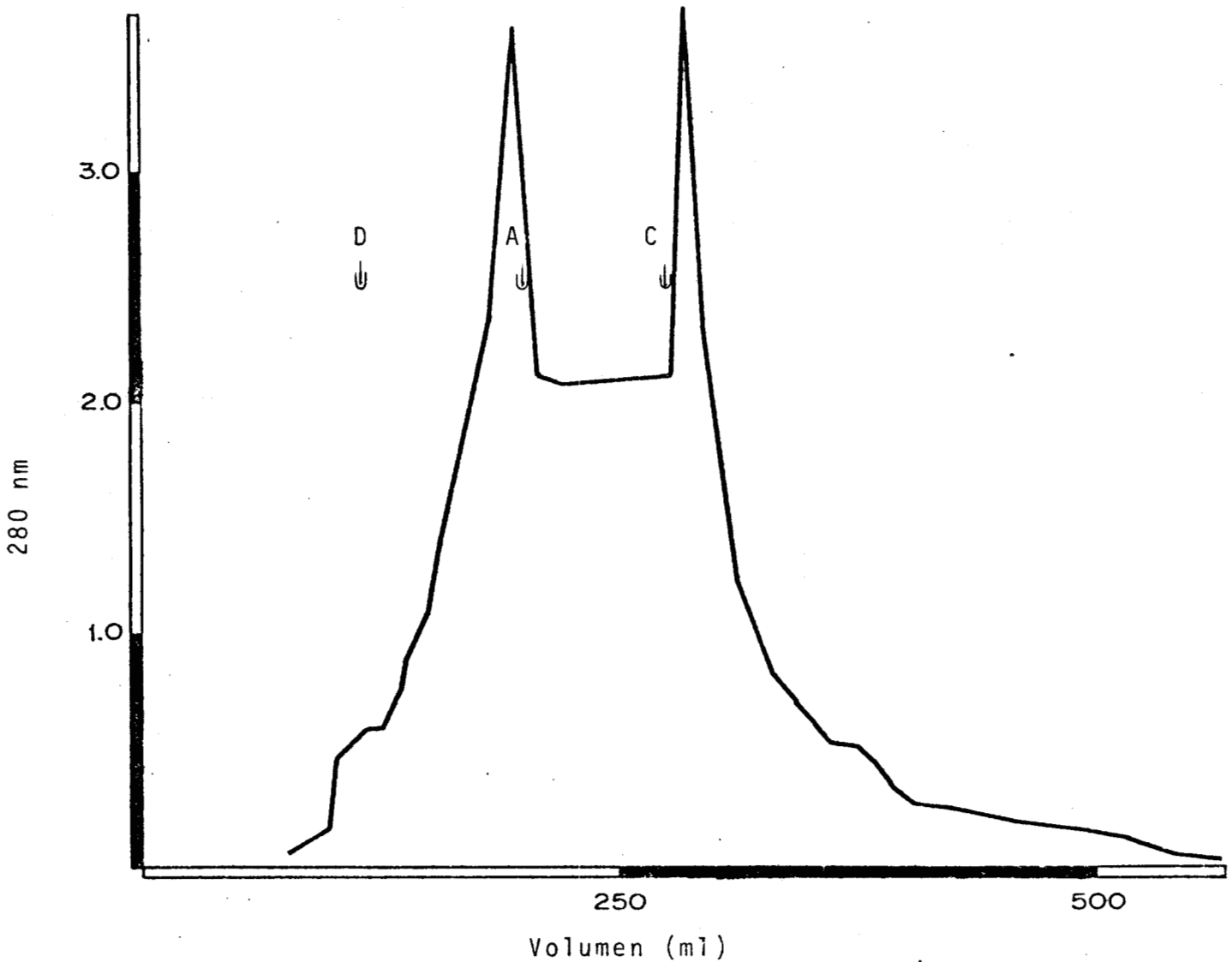


Figura 3. Cromatografía del extracto salino de tabaco con Tritón-X-100 en Sephadex-G-100. Se muestran 3 picos, uno de 200,000 y 2 de pesos moleculares de 60,000 y 10000 D aprox. Las marcas corresponden a los patrones de referencia. Dextran (200,000), Albúmina sérica bovina (67,000), Citocromo C(12,500). Volumen vacío 100 ml.

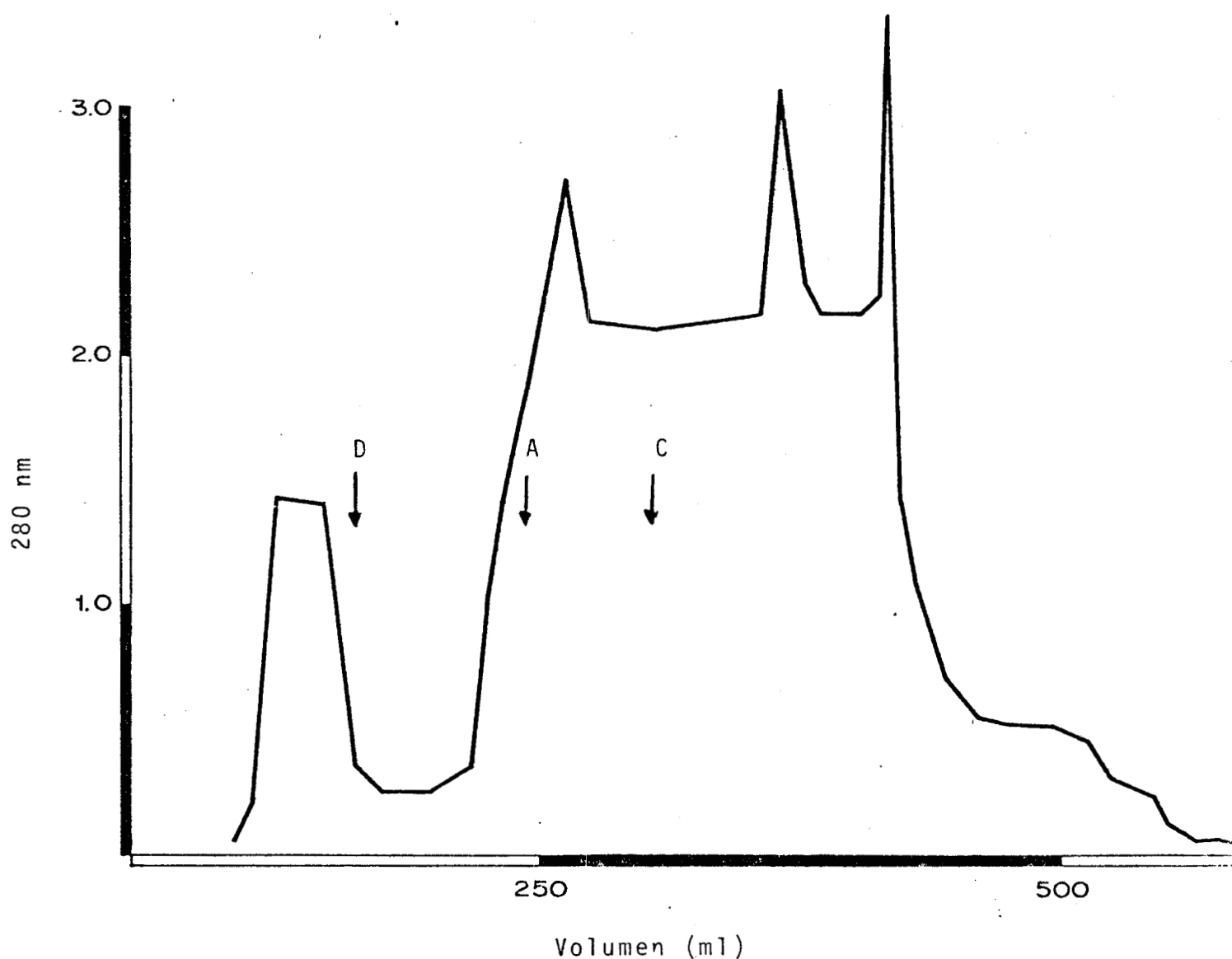


Figura 4. Cromatografía del extracto salino de tabaco con dodecilsulfato de sodio en Sephadex-G-100. Se muestran 4 picos de peso molecular 200,000; 60000 y 2 menores a 10000 D. Las marcas corresponden a los patrones de referencia. Dextran (200,000) albúmina sérica bovina (67,000), Citocromo C(12500). Volumen vacío 100 ml.

tiextractos salinos por microdobleinmunodifusión y contrainmunoelectroforesis. Tanto la fracción I, como la II, fueron obtenidos con el material eluido de pH 8. Los resultados se muestran en la figura 5.

#### CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO SALINO EN CM-CELULOSA.

El extracto salino en CM-Celulosa, dió 5 fracciones, de las que las II y III mostraron bandas de precipitación cuando se enfrentaron con los anticuerpos antiextracto salino por contrainmunoelectroforesis. Los resultados y el perfil se muestran en la figura 6.

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Los extractos salinos y el condensado de humo, junto a un patrón de bajo peso molecular, se corrieron en geles de poliacrilamida con SDS. A excepción del condensado de humo, donde no se registraron bandas, los extractos salinos dieron bandas cuyos pesos moleculares no fueron mayores a 20 KD, ni menores a 15KD. En la figura D se muestran los resultados anotados.

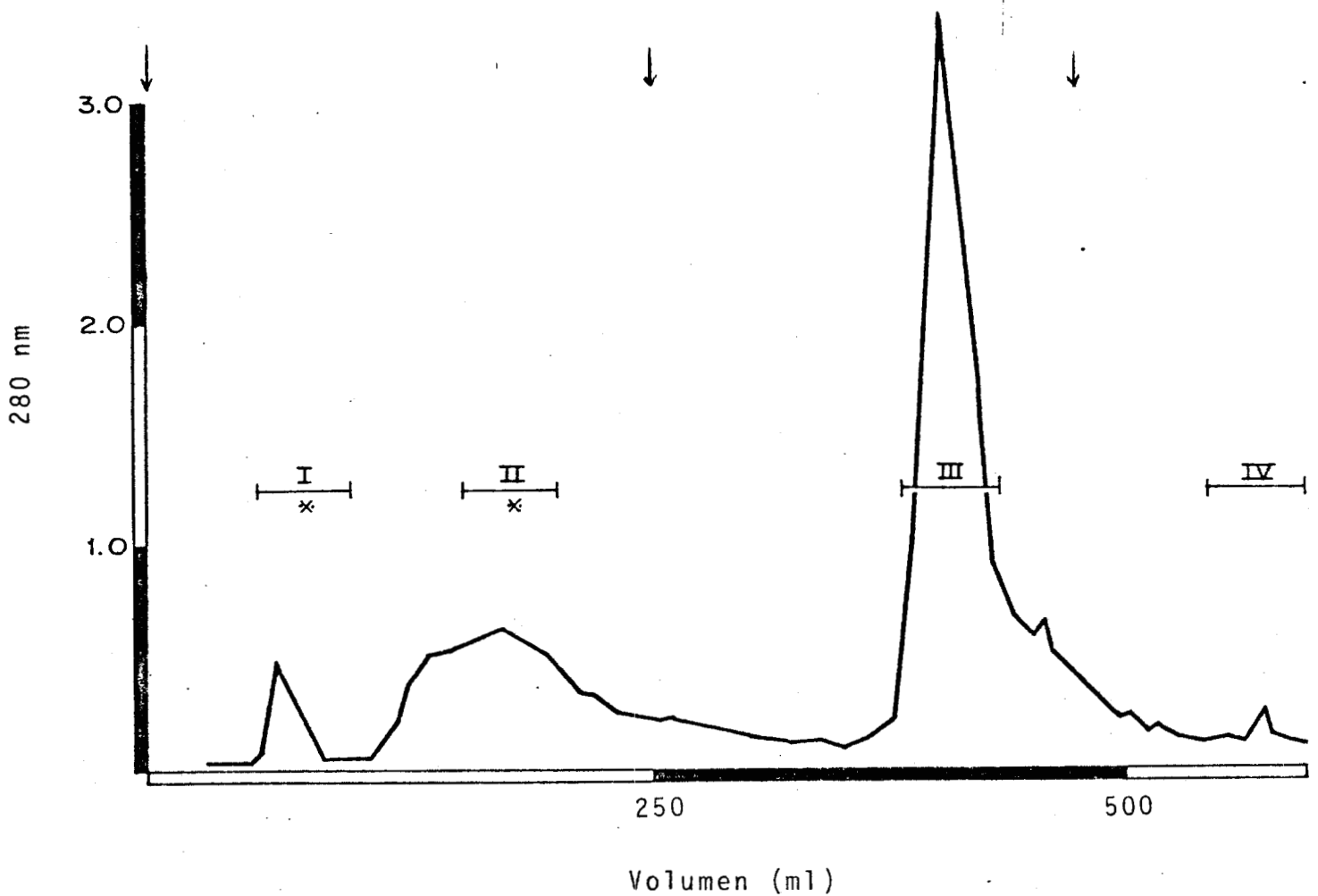


Figura 5. Cromatografía del extracto salino de tabaco en DEAE-CELULOSA.

Las fracciones I y II dieron bandas de precipitación con los anticuerpos antiextracto salino por microdoble inmunodifusión y contra inmuno electrophoresis. Las señas corresponden a las soluciones de elución:  $\text{PO}_4$  0.01M, pH 8.0;  $\text{PO}_4$  NaCl 3M, pH 5.7;  $\text{PO}_4$  NaCl 3M. pH 5.

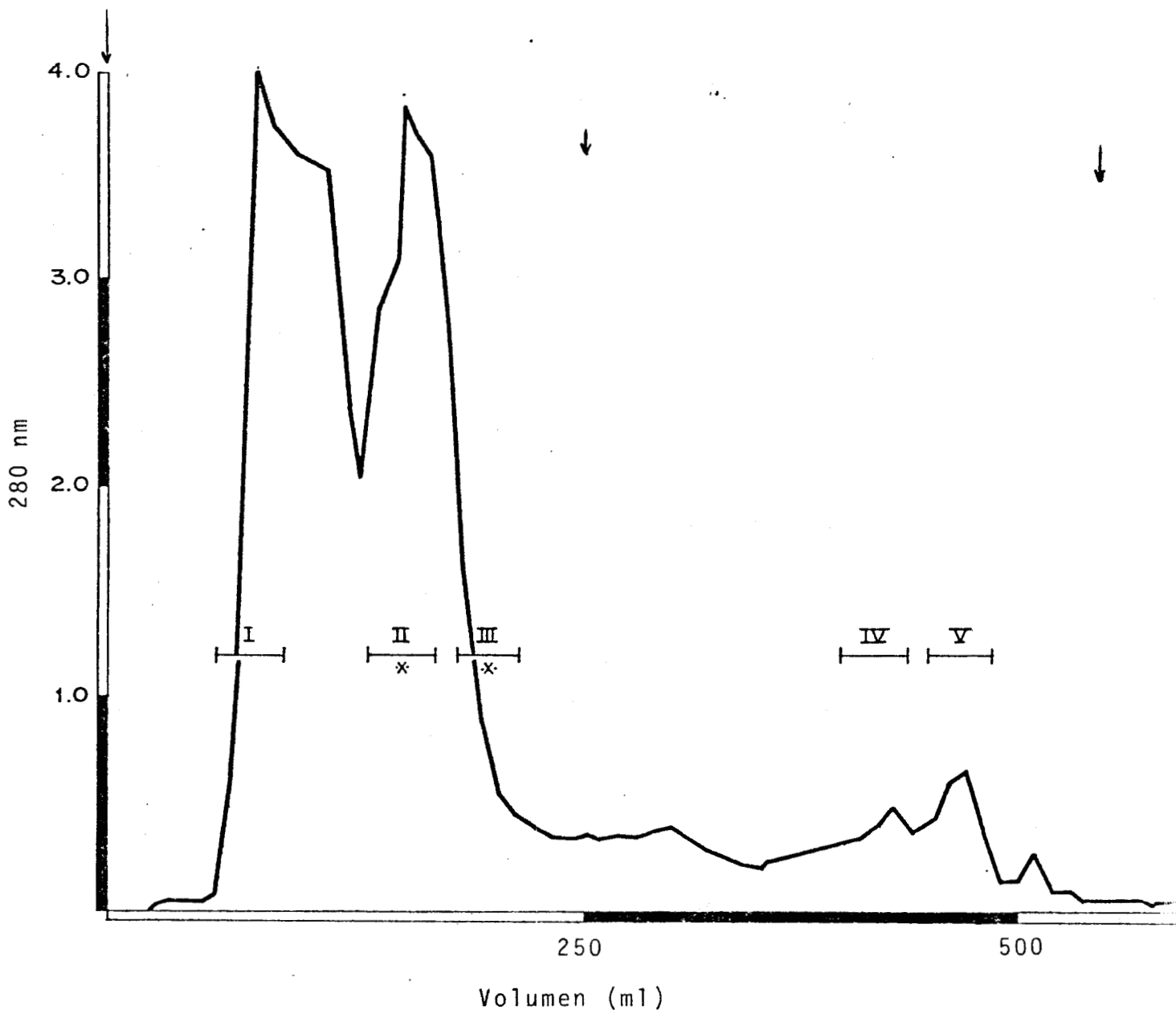


Figura 6. El perfil corresponde a la cromatografía del extracto salino de tabaco en CM-Celulosa. Las fracciones II y III dieron bandas de precipitación cuando se enfrentaron a los anticuerpos antiextracto salino por contraínmunolectroforesis. Las marcas corresponden a las soluciones de elución empleadas. PO<sub>4</sub> 0.01M. pH5.; PO<sub>4</sub> NaCl 3 M pH 5.7; PO<sub>4</sub> NaCl, 3M pH8.

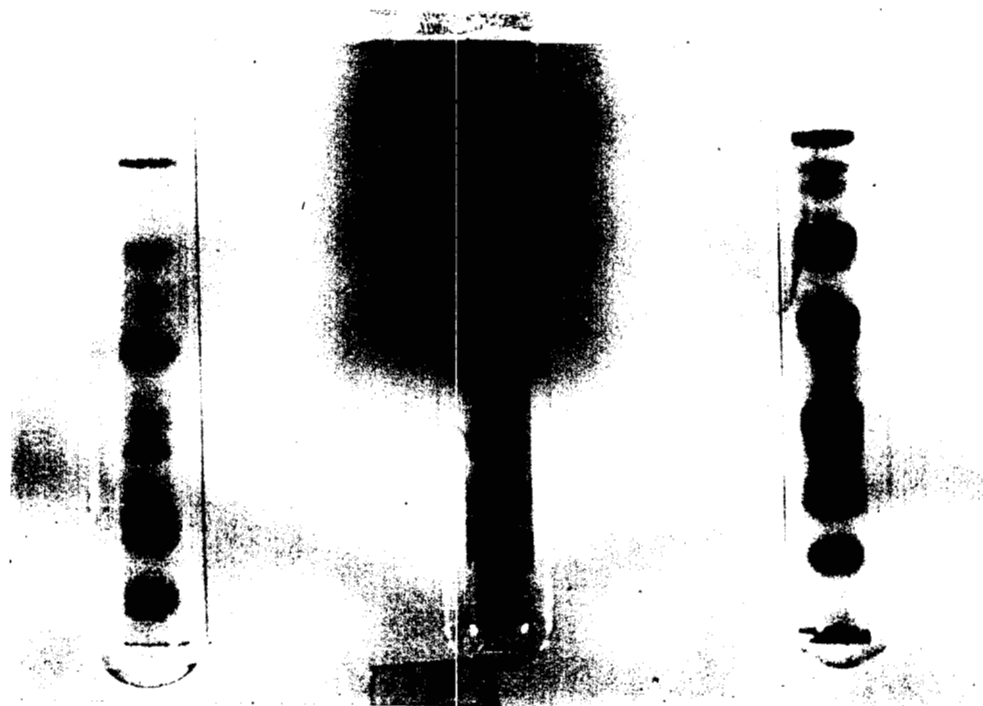


Figura D. Se muestra una electroforesis en poliacrilamida-SDS. Del extracto salino, (tubo central), a los extremos se presentan patrones de referencia utilizado a diferente concentración.

## REACTIVIDAD DE LOS CIGARRILLOS COMERCIALES CON LOS ANTICUERPOS ANTITABACO,

Los anticuerpos antiextracto salino de tabaco se enfrentaron a los extractos de diversos tipos de cigarrillos comerciales. También estos extractos fueron enfrentados así mismo con el suero de un paciente infartado y que fumaba. Se consideró positiva la reacción al haber por lo menos una banda de precipitación entre los anticuerpos y el suero con los extractos usados. Por la microdoble inmunodifusión se encontraron hasta 3 bandas con algunos extractos y a excepción del extracto de cigarrillos marca Delicados, que mostraron una banda, el resto no dieron bandas de precipitación al enfrentarlos con el suero del paciente con infarto de miocardio (tabla XIII). Por contra inmuno electrophoresis, con los anticuerpos se determinaron hasta 2 bandas como máximo y todos los extractos de los diferentes cigarrillos mostraron una banda con el suero del paciente infartado (tabla XIV).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS DE TABACO,

Se observó que los extractos de tabaco aglutinaban eritrocitos humanos y de borrego, al tratar de sensibilizarlos



TABLA XIII.

EXTRACTOS DE CIGARRILLOS CONTRA ANTICUERPOS ANTITABACO POR  
MICRODOBLEINMUNODIFUSIÓN.

---

<u>MARCA</u>	<u>S398</u>	<u>G.398</u>	<u>G.396</u>	<u>181809</u>
BARONET	0*	1	1	0
COMMANDER	1	1	1	0
DELICADOS	3	2	1	1
DEL PRADO	1	1	0	0
FIESTA	1	1	1	0
MARLBORO	1	1	1	0
MARLBORO				
LIGHTS	1	1	0	0
RALEIGH	0	1	1	0
SALEM	2	1	0	0

---

S,398, G.396 y G.398: Suero Total y Gammaglobulina

181809 Suero de un sujeto con infarto agudo de miocardio  
(fumador)

\* Número de bandas de precipitación.

TABLA XIV.

EXTRACTOS DE CIGARRILLOS CONTRA ANTICUERPOS ANTITABACO  
POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

---

<u>MARCA</u>	<u>S398</u>	<u>G396</u>	<u>G398</u>	<u>181809</u>
BARONET	1*	1	1	1
COMMANDER	1	1	1	1
DELICADOS	1	1	0	1
DEL PRADO	0	1	1	1
FIESTA	2	1	1	1
MARLBORO	2	2	2	1
MARLBORO LIGHTS	2	1	2	1
RALEIGH	1	1	2	1
SALEM	1	1	1	1

---

S.398, G396 y 398: Suero total y Gammaglobulina

181809 Suero de un sujeto con infarto agudo del miocardio  
(fumador).

\* Número de bandas de precipitación.

(tablas XV, XVI) con los resultados mencionados se intentó purificar la "lectina" de tabaco por hemoabsorción, incubando los eritrocitos glutaraldehizados con los extractos de tabaco a 37°C por una hora, con agitación continua, después se lavaron los eritrocitos hasta eliminar la lectina, con la que se probó su capacidad hemaglutinante, con un título de aglutinación de 2 para extracto salino, con dodecilsulfato sódico y con triton X 100 y el título obtenido con el extracto con tween 20 fue de UNO. (tabla XVII).

TABLA XV.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE LOS  
EXTRACTOS DE TABACO.

---

ERITROCITOS HUMANOS RH POSITIVO.	ES*	ESDS	ETX100	ET20
TIPO O.	1.7**	3.0	0	4.6
TIPO O GLUTARALDEHIZA- DOS.	0.3	2.0	0.6	2.0
TIPO A.	3.2	7.6	0	16.0
TIPO A GLUTARALDEHIZA- DOS.	2.6	1.6	0.3	3.0
TIPO B	0.9	2.9	0	5.3
TIPO B GLUTARALDEHIZA- DOS	2.7	1.8	0.5	3.3
TIPO AB	0.1	12.1	0	3.0
TIPO AB GLUTARALDEHIZA DOS.	4.6	4.8	0.7	5.5

---

\* Ver tabla de abreviaturas

\*\*Reciproca del título de hemaglutinación (10 sujetos).

TABLA XVI.

HEMAGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS DE BORREGO POR  
EXTRACTOS DE TABACO.

---

ES*	ESDS	ET20
16**	128	4

---

\* Ver tabla de abreviaturas

\*\*Recíproca del Título de Aglutinación de Eritrocitos de Borrego.

TABLA XVII.

AGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS TIPO A RH POSITIVO CON  
LECTINAS DEL TABACO PURIFICADAS POR HEMOABSORCIÓN.

---

EXTRACTO	CONTROL	LECTINA
ES*	2**	2
ESDS	E	2
ETX100	E	2
ET20	E	2

---

\* Ver tabla de abreviaturas

\*\*Recíproca del Título de Aglutinación.

DISCUSSION.

## DISCUSION.

### CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LOS EXTRACTOS Y CONDENSADO DE HUMO DEL TABACO.

Como se vió, mientras los extractos salinos y con detergentes tuvieron un promedio de 3.0 mg/ml concentración de proteínas, el condensado de humo alcanzó una concentración de 22 mg/ml de proteínas. Esta concentración fue mayor de la esperada, considerando que la incineración de los cigarrillos, sería capaz para destruir todo material protéico y además de la dificultad de atrapar a éste en el humo; pero se consideró la posible formación de un gradiente de temperatura en el cigarrillo, lo cual puede "arrastrar" ciertos componentes como haptenos, o productos de desnaturalización de las proteínas del tabaco, las que al introducirse con el aire inhalado durante la aspiración del humo del tabaco, podrían estimular la respuesta inmune contra los antígenos del tabaco.

### CONCENTRACIÓN DE LAS GAMMAGLOBULINAS DEL TABACO.

A partir de los resultados obtenidos de 56. y 30 mg/ml de concentración protéica promedio, para los conejos inmunizados con extracto salino y condensado de humo respectivamente, hay que señalar que la obtención de las gammaglobulinas,



en algunos casos disminuyó la positividad de los sueros, lo cual pudiera reflejar cierta susceptibilidad a la degradación de los anticuerpos antitabaco, o bien de que sean de clase IgM que se puede eliminar parcialmente al precipitar con sulfato de amonio, para purificar inmunoglobulinas.

#### INMUNIZACIÓN.

Los métodos como microdobleinmunodifusión, contrainmunoelectroforesis y electroinmunodifusión permitieron reconocer anticuerpos específicos contra los antígenos del tabaco contenidos en el extracto salino y el condensado de humo, aunque por microdobleinmunodifusión y electroinmunodifusión, no se detectaron bandas de precipitación donde se encontraba el condensado de humo, si se obtuvieron por contrainmunoelectroforesis. Además tanto en Microdobleinmunodifusión, como en contrainmunoelectroforesis, se detectaron hasta 3 bandas en algunos sistemas. Lo que indicaría la presencia de uno a tres antígenos en los extractos de tabaco y a pesar de que el condensado de humo, la cantidad de material inmunoreactivo se considera baja, es suficiente para estimular la respuesta inmune en los sujetos fumadores.

## CROMATOGRAFÍA DE LOS EXTRACTOS SALINOS Y EL CONDENSADO DE HUMO DEL TABACO.

En Sephadex G100, el condensado de humo del tabaco dió un solo pico, indicando la presencia de material proteico, que no fue completamente destruido por el proceso de combustión, o bien que las proteínas del cigarrillo vayan migrando como en una columna por efecto del "gradiente de temperatura" y por lo tanto puedan ser atrapadas en el humo. En los extractos salinos solos y con triton-X-100, los perfiles fueron muy similares con 3 picos y 4 el que corresponde al extracto salino con dodecilsulfato de sodio, todos con un rango de pesos moleculares semejantes y cerca a 19KD, peso referido por Becker y colaboradores (18,25). Sin embargo, estos datos pueden modificarse si se comprueba que los antígenos o algunas proteínas de los extractos, son retenidos en la columna, como lo determinan estudios recientes (70).

En DEAE-Celulosa el extracto salino dió 4 picos, de los cuales el I y II obtenidos con la primera solución de elución pH<sub>0</sub>, dieron bandas de precipitación cuando se enfrentaron a los anticuerpos antiextracto salino por las técnicas de microdobleinmunodifusión y contrainmunolectroforesis. Los resultados sugieren que los antígenos o proteínas de

ellos poseen carga aniónica.

En CM-Celulosa, el extracto salino dió 5 fracciones de las cuales la II y la III reaccionaron con los anticuerpos antiextracto salino formando bandas de precipitación por contra inmunolectroforesis, más no por microdobleinmunodifusión.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Tanto el extracto salino como con triton X 100, mostraron de 2 a 3 bandas cuyos pesos moleculares se aproximaban a 18 Kd. Estos resultados son muy similares a los descritos anteriormente por Becker y Col (18), donde se encontró una glicoproteína de 18000 de peso molecular.

No se observaron bandas en el condensado de humo, aunque en sephadex G 100, encontramos un pico en el condensado de humo, en la poliacrilamida-SDS no se detectaron bandas, lo que pudo deberse a una concentración muy baja de este material, o bien a que el proceso de digestión y desnaturalización, hubiera reducido notablemente el tamaño de las proteínas ó cadenas polipptídicas, y permitido la liberación de pequeñas susancias ó moléculas como haptenos entre otros y que no sean registrados.

## REACCIONES CRUZADAS DE ANTÍGENOS DE TABACO DE DIFERENTE ORIGEN.

Los anticuerpos antiextracto salino se enfrentaron a extractos de cigarrillos de algunas marcas, y se obtuvieron bandas de precipitación en microdoubleinmunodifusión y contrainmunolectroforesis, sugiriendo que la proteína contenida en el antígeno (S) del tabaco, no sufre alteraciones en su estructura antigénica a pesar de los procesos industriales utilizados en la fabricación de cigarrillos con el objeto de mejorar el sabor o modificar sus componentes. Lo que indica que hay antígenos que son comunes al tabaco utilizado para elaborar los diferentes tipos de cigarrillos.

## FRECUENCIA DE ANTICUERPO ANTITABACO EN EL SUERO DE PACIENTES CARDIOPATAS.

El hallazgo de 55.0, 65.0 y 33.0% de positividad obtenidos con los extractos con detergentes: SDS, Triton X 100 y Tween 20, por microdoubleinmunodifusión; y del 94, 63 y 58 por contrainmunolectroforesis fundamentaron la presencia de anticuerpos antitabaco, en sujetos fumadores, o no, o sanos, o con infarto de miocardio. En individuos sanos y fumadores por microdoubleinmunodifusión se obtuvo 44 y 46% contra los extractos con triton X 100 y tween 20 y 27 y 41%

en individuos sanos no fumadores.

Por contraimmunoelectroforesis el porcentaje de positividad fue del 54, 81,80 y 53% contra extracto salino, extracto con SDS, extracto con triton X 100 y extracto con tween 20 en sujetos fumadores y 72,77,75 y 58% respectivamente en los no fumadores. Los resultados permiten establecer la alta frecuencia de individuos con anticuerpos antitabaco y que se presentan independientemente que los sujetos sean o no fumadores, datos diferentes de los reportados por Romansky y Col.(22). En los pacientes con infarto de miocardio se obtuvo 31 y 23% de positividad al enfrentar sus sueros con los extractos salino y con SDS, en fumadores y 31 y 18% respectivamente en los pacientes con infarto de miocardio pero no fumadores por microdobleimmunodifusión; mientras que en contraimmunoelectroforesis fue de 73 y 94% de positividad en los pacientes con infarto del miocardio y fumadores; 68 y 93 respectivamente en los pacientes con infarto del miocardio pero no fumadores, no existiendo diferencia entre los sujetos con infarto de miocardio, sean o no fumadores, lo que resulta diferente de los datos establecidos por Romansky y Col.(9,24,30). En donde no se detectaron anticuerpos antitabaco en los individuos no fumadores, por la técnica de doble difusión.

En los sueros de cardiópatas se determinó hasta un 63% de positividad contra el extracto salino con triton X 100.

El porcentaje de positividad en individuos sanos, fumadores fue de 45 y en pacientes con infarto de miocardio y fumadores fue de 32, por microdobleinmunodifusión, resultados que coinciden con los descritos por Romansky y colaboradores (9,24,30). Sin embargo por contraimmunoelectroforesis los porcentajes fueron mayores, a pesar de no existir diferencias con respecto a la resolución de bandas, por los métodos de microdobleinmunodifusión y contraimmunoelectroforesis (2), parece ser que el antígeno de tabaco obligado a migrar por el campo eléctrico reconoce con mayor potencia al anticuerpo específico.

#### HEMAGLUTINACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TABACO Y DEL CONDENSADO DE HUMO.

Debido a la frecuencia de reacciones positivas en los sueros de individuos que eran o no fumadores, se propuso la cuantificación de los anticuerpos antitabaco y se les encontró actividad hemaglutinante en los extractos de tabaco y en el condensado de humo tanto en eritrocitos humanos como de borrego. Dado que esto se presentaba en los extractos de tabaco, se probaron extractos de otros miembros de la fami-

lia de las solanaceas como la papa y el jitomate (69). Al igual que los extractos de tabaco, se prepararon los de papa y jitomate, su reactividad se probó con algunos sueros de pacientes e individuos sanos, encontrando una mayor positividad con los extractos de papa, pero siempre menor a la de los extractos de tabaco y tanto el extracto de papa, como el de jitomate mostraron actividad hemaglutinante.

Los extractos mostraron diferente afinidad por los tipos sanguíneos de los eritrocitos humanos; el tabaco aglutinó preferentemente a eritrocitos A; el jitomate a los AB y la papa a los B. Sin embargo se requiere establecer claramente si la actividad hemaglutinante de los extractos se debe a una lectina y si las bandas de precipitación que se forman cuando se enfrentan los sueros de humanos o de conejos inmunizados contra los extractos de tabaco se debe a la interacción entre glicoproteínas sericas y la supuesta lectina ó es una reacción antígeno anticuerpo.

Considerando que el tabaquismo es un factor de riesgo importante por el efecto tóxico de sus componentes; por la actividad farmacológica de los compuestos y por la respuesta inmune antitabaco que se produce en los sujetos fumadores que pueden participar en el daño cardiovascular, las enfermedades coronarianas y pulmonares, entre otras, se

necesita la investigación posterior en la elucidación de los procesos mencionados.



CONCLUSIONES.

## CONCLUSIONES

1. El extracto salino de tabaco es más inmunogénico que el condensado del humo de tabaco.
2. La técnica de contraelectroforesis dió mayor número de sistemas antígeno-anticuerpo y mayor porcentaje de positividad.
3. Por la técnica de microdoble inmunodifusión los resultados obtenidos del 32 al 45% de positividad en sujetos fumadores fueron similares a los reportados en la literatura.
4. La caracterización de las moléculas antigénicas en los extractos muestran que tienen carga aniónica y un peso molecular de 18 Kd aproximadamente.
5. Los porcentajes de positividad de anticuerpos antitabaco en sujetos con infarto de miocardio, sanos, fumadores y no fumadores no tuvieron una diferencia notable entre ellos.
6. El infarto de miocardio se presentó en personas con una edad promedio de 60 años, pero sin encontrar una relación estrecha con la presencia de anticuerpos antitabaco.

7. Los extractos de tabaco y el condensado de humo aglutinaron eritrocitos humanos y de borrego probablemente debido a que contienen una lectina; pero se requiere descartar otros compuestos hemaglutinantes.

BIBLIOGRAFIA.

## BIBLIOGRAFIA

1. PEÑA, M. JOSE. Inmunología. Ediciones Pirámide. S.A.  
1a ed. Madrid. 1982.
2. FUDENBERG, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. and Wells,  
J.V. Inmunología Clínica. Editorial El Manual  
Moderno. 2a. Ed. México, D.F. 1980.
3. ROITT, IVAN. Inmunología Esencial. Editorial Jims 3a.  
Ed. en Español Barcelona,1978.
4. MORETTA, L. and Fancy, A. Subpopulations of Human  
T Lymphocytes. Immunol. Today 1:3,1980.
5. SWAIN, S.L. and Dutton, L.W. Mouse T Lymphocyte  
subpopulations. Relationships Between Function  
and Lyt Antigen Phenotype. Immunol. Today  
1:61, 1980.
6. WATSON, J., Mochizuki, D., and Gillis, S. T Cells  
Growth Factors: Interleukin 2. Immunol. Today  
1:113,1980.

7. ALTMAN, A. T Cells Growth Factors (interleukin 2) Immunol. Today 2: 1, 1981.

8. RIVERO, O., Cano, F., Rábago, J., Vera, E. y Fernández, P. Tabaquismo en México. Neumol. Cir. Torax, Mex. 37:181, 1976.

9. ROMANSKY, B., Broda, S. and Swiatkowsky, M. The Immunological Response to Tobacco Antigens in Smokers. II Specific Precipitins Against Tobacco Antigens in The Serum of Smoker Suffering from Coronary Heart Disease. Allergol. et Immunophatol. 6: 383, 1978.

10. HARRIS, M.C. and Shure, N. Sensitivity Chest Disease. Davis, 93. California. 1964.

11. BLUE, J.A. Cigarette Asthma and Tobacco Allergy . Ann. Allergy. 28: 110, 1970.

12. PANAYATOPOULOS, S., Gotsis, N., Papazoglou, N. and Concouris, L. Antigenic Study of Nicotiana Tabacum and Research on Precipitins Against

Tobacco Antigens in the Serum of Smokers and Non-smokers. *Allergol. et Immunopathol.* 2: 111, 1974.

13. HARKAVY, J. and Perlman, E. Tobacco Allergy in Coronary Artery Disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90: 327, 1960.
14. AUERBACH, O., Hammond, E.C. and Garfinkel, L. Smoking in Relation to Atherosclerosis of the Coronary Arteries. *New. Eng. J. Med.* 273:775, 1965.
15. GREEN, G.M. and Carolin, D. The Depressant Effect of Cigarette Smoke on the In vitro Antibacterial Activity of Alveolar Macrophage. *New. Eng. J. Med.* 276:421, 1967.
16. ROSE, G. Smoking and Cardiovascular Disease. *Am. Heart J.* June, 838, 1973.
17. KELLER, K.F. and Doyle, R.J. A Mechanism for Tobacco Smoke-Induced Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 57:278, 1976.

18. BECKER, C.G., Dubin, T. and Wiedemann, H.P. Hipersensitivity to Tobacco Antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 1712, 1976.
19. BECKER, C.G. The Thrombotic Process in Atherogenesis, Advances in Experimental Medicine and Biology 104: 371, 1977.
20. HARPER, H.A. Química Fisiológica. Editorial el Manual Moderno, 2a ed. México, D.F. 1969.
21. ROJAS, W. Inmunología 4a. ed. Ed. Colina-FEISA. Medellín, Colombia 1978.
22. ROMANSKY, 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 et Immunopathol. 5: 659, 1977.
23. ROMANSKY, B., Broda, S., Swiatkowsky, M. and Zbikowska, M. the Immunological Response to Tobacco Antigens in Smokers. III. Type III Hipersensitivity Skin Reactions and Specific Serum Precipitins to Four Different Tobacco



Extracts in Patients Suffering from Coronary Heart Disease. *Allergol, et Immunopathol.* 7: 187, 1979.

24. LEHRER, S.B., Wilson, M.R. and Salvaggio, J.E.  
Immunogenic Properties of Tobacco Smoke.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 62: 368, 1978.
25. BECKER, C.G. and Dubin, T. Activation of Factor XII.  
By Tobacco Glycoprotein, *J. Exp. Med.* 146:  
457, 1977.
26. GLEICH, G.J. and Welsh, P.W. Immunochemical and  
Physicochemical Properties of Tobacco Extracts.  
*Am. Rev. Respir. Dis.* 120: 995, 1979.
27. BECKER, C.G., Levi, R. and Zavec J. Induction of IgE  
Antibodies to Antigen Isolated from Tobacco  
Leaves and from Cigarette Smoke Condensate.  
*Am. J. Pathol.* 96:249, 1979.
28. JACOB, C.V., Stelzer, G.T. and Wallace, J.H. The Cellular  
Basis of Immunosuppression by a Water Soluble  
Condensate of Tobacco Smoke. *Immunol.* 40:621,  
1980.

29. ROSTENBERG, I., Peñaloza, R., Guízar, J., Cicero, R., Olivares, A. y Armendares, S. Contenido Anormal del Carbohidrato de la IgG en Fumadores Asintómaticos. Rev. Invest. Clin. (Mex) 33:45, 1981.

30. ROMANSKY, B., Broda, S., Swiatkowsky, M. and Zbikowska, M. The Immunological Response to Tobacco Antigens in the Smoker. V. Plasma Concentrations of Immunoglobulin and Some Complement Components in Tobacco Hipersensitive Patients Suffering from Coronary Artery Disease. Allergol. et Immunophatol. 9: 487. 1981.

31. LEVI, R., Zavecz, J.H., Burke, J. and Becker C.G. Cardiac and Pulmonary Anaphylaxis in Guinea Pigs and Rabbits Induced by Glycoprotein Isolated from Tobacco Leaves and Cigarette Smoke Cordensate. Am. J. Pathol. 106:313, 1982.

32. DILLON, L., Glenn, F. and Becker, C.G. Induction of Acalculous Cholecystitis and Pneumonitis in Dogs Following Inhalation of Constituents of Cigarette Smoke Condensate. Am. J. Pathol. 109: 253, 1982.

33. ANDERSEN, P., Pedersen, O.F. Bach, B. and Bonde, G.J.  
Serum Antibodies and Immunoglobulins in Smokers  
and Non-Smokers. Clin. Exp. Immunol. 47: 467,  
1982.
34. 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, Médi  
ca Mexicana 117: 46, 1981.
35. SILVERMAN, N.A., Potvin, C. Alexander, J.C. and Chretien,  
P.B. In Vitro Lymphocyte Reactivity and T-cells  
Levels in Chronic Cigarette Smokers. Clin. Exp.  
Immunol. 22: 285, 1975.
36. WARR, G., Martin, P.R., Holleman, C.L. and Criswell, S.  
Lymphocyte of Bronch alveolar Lavage. Am. Rev.  
Respir. Dis. 113: 96, 1976.
37. ZALOKAR, J.B., Richard, J.L. and Claude, J. Leukocyte  
Count, Smoking and Myocardial Infarction. New  
Eng. J. Med. 304: 465, 1981.

38. ALITALO, K., Hovi, T. and Vaheri, A. Fibronectin is Produced by Human Macrophages J. Exp. Med. 151: 602, 1980.
39. VILLIGER, B., Broekelmann, T., Kelley, D., Heymach III, G.J. and MacDonald, J.A. Bronchoalveolar fibronectin in Smokers and Nonsmokers. Am. Rev. Respir. Dis. 124:652, 1981.
40. FINCH, G.L., Fischer, G.L. Hayes, T.L. and Golde, D.W. Surface Morphology and Functional Studies of Human Alveolar Macrophages from Cigarette Smokers and Nonsmokers. J. Reticuloendothel. Soc. 32: 1, 1982.
41. GINNS, L., Goldenheim, P.D. Miller, L.G., Burton, R.C., Gillick, L., Colvin, R.V., Goldstein, G., Kung, P.C., Hurwitz, C. and Kazemi, H. T-Lymphocyte subsets in Smoking and Lung Cancer. Am. Rev. Respir. Dis. 126: 265 , 1982.
42. MILLER, L.G., Goldstein, G., Murphy, M. and Ginns, L.C. Reversible Alterations in Immunoregulatory T-Cells in Smoking. Chest 82: 526, 1982.

43. MARTINEZ, R.D., Balseiro, L. y Lomeli, M.M. La Cinética de la Respuesta Inmune a los antígenos cardíacos. Arch. Inst. Cardiol. (Mex). 45: 720, 1975.
44. MARTINEZ, R.D., Bialostosky, D. y Bassoti, R. Estudio Inmunológico en Pacientes con Infarto Agudo del Miocardio. I. Análisis Inmunoserológico. Arch. Inst. Cardiol. (Mex) 48: 414, 1978.
45. LOWRY, H.O., Rosebrough, J.N., Farr, L.A. and Randall, J.R. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1957.
46. SALDUA, A.L. Los Anticuerpos Anti-Corazón y Anti-Estreptococo en los Padecimientos Cardiovasculares. Tesis I.P.N. E.N.C.B. 1982.
47. WADSWORTH, C. A microtechnique employing a gel chamber compared with other micro and macroplate technique for immune diffusion. Int. Arch. Allergy 21: 131, 1962.
48. GARCIA, R.G. Caracterización Inmunológica de Mitocondrias Cardíacas. Tesis. UNAM. Facultad de Ciencias. 1981.

49. BACILIO, J.M. Fraccionamiento y Caracterización Inmunológica de los Antígenos Insolubles de Corazón Humano. Tesis I.P.N. E.N.C.B. 1981.
50. NOWOTNY, A. Basic exercises in Immunochemistry Ed. Springer-Berlag. 2nd. Ed. Berlin-Heidelberg. New York, 1979.
51. WEBER, K. and Osmond M. The Reability of Molecular Weight Determinations by Dodecilsulfate Poliacrylamida Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406, 1969.
52. ONKELINX, E., Meuldermans, M. and Lontie, R. Glutaraldehyde as a couplin reagent in passive hemagglutination. Immunol. 16:35, 1969.
53. FISCHER, L. An Introduction to Gel Cromatography Ed. T.S. Work and Work. North Holland, 1971.
54. LEDERER, E. and Lederer M. "Chromatography: A Review of Principles and applications". 2a. ed. American Elsevier Publishing Co. New York, 1957.

62. GARLAND, J.M. Interleukin 3 a new limphokine?  
*Immunol. Today* 3: 208, 1982.
63. CAMPBELL, D.H., Garbey, J.S., Cremer, N.E. and Susdorf,  
D.H. *Methods in Immunology* 2nd.Ed. Benjamin Inc.  
New York. 1970.
64. BURROWS, B., Halonen, M., Lebowitz, M., Knudson, R. and  
Barbee R. The Relationship of serum  
immunoglobulin E, allergy skin tests, and smoking  
to respiratory disorders, *J. Allergy. Clin.*  
*Immunol.* 70: 199, 1982.
65. LARSON, P.S., Haay, H.B. and Silvette P. *Tobacco Experimental  
and Clinic Studies.* The Williams and Williams  
Co. Baltimore 1961.
66. GLENN, A.W. and Martin R. Immune Receptors of Human  
Alveolar Macrophages: Comparison between cigarette  
Smokers and Non smokers. *J. Reticuloendothel.*  
*Soc.* 22: 181, 1971.

55. KAPLAN, M.H. and Frengley, J.D. Autoimmunity to the heart in cardiac Disease. Am. J. Cardiol. 24: 459, 1969.
56. SHAPIRO, A.L., Viñuelas, E. and Maizel, J.V. Autoimmunity Biochem. Biophys. Res. Com. 28: 815, 1967.
57. BICK, R.L., Stedman, D.L., Kronick, P.L., Hillman, E. and Farred, J. Studies related to tobacco Glycoprotein. A claimed activator of Coagulation, Fibrinolysis, Complement, Kinin and a Claimed Allergen. Thrombosis and Haemostasis 46: 231. 1981.
58. SPAIN, M.D. Atherosclerosis. Sci. Amer. 215: 48, 1976.
59. GRABAR, P. and Williams, C.A. Méthode Immunoelectrophoretique D' Analyse de Melanges de Sustances Antigeniques. Biochem. Biophys. Acta. 17: 67, 1955.
60. BRAY, M.A. Prostaglandins: Fine tuning the immune system? Immunol. Today. 1: 65, 1980.
61. SAMUELSSON, B. and Hammarstrom, S. Slow-Reacting Substances and Leukotrienes. Immunol. Today 2: 3, 1981.



67. BECKER, C.G. and Minck, C.R. The role of Immunologic Injury in the Pathogenesis of Atherosclerosis. In: Clinical Immunology of the Heart. Edited By: J.B. Zabriskie, M.A. Engle, and H. Villarreal Jr. John Wiley and Sons. New York. 1977.
68. FIRPO, A., Polley, M.J. and Becker, C.G. The effect of tobacco derived products on the human complement system. Immunobiol. 164: 318, 1983.
69. LAWRENCE, G. Taxonomy of vascular plants MacMillan Publishing Co. Inc. N.Y. 1951.
70. PEREZ, S., Moreno, A, Rodríguez, G., y Martínez R.D. 1983. Datos no publicados.
71. BURNET, M. Auto-immunity and autoimmune Disease F.A. Davis. Company Philadelphia. 1972.

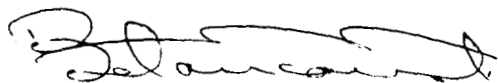
EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA APROBO ESTA TESIS EL DIA 9 DEL MES DE DICIEMBRE DE 1983.



DR. RUBEN DARIO MARTINEZ PEREZ



DRA. ANA FLISSER DE MARTINEZ



DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE