

Tabaquismo: Alteraciones inmunológicas de los alveólos pulmonares inducidas por el uretano

Rubén D. Martínez, Marcela García

Departamento Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM

(Recibido, septiembre 12, 1994; aceptado, septiembre 13, 1995)

Resumen

El tabaquismo se ha identificado como un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades pulmonares, cardiovasculares y del cáncer. La combustión del tabaco produce una serie de procesos físico-químicos en un ambiente deficiente en oxígeno y rico en hidrógeno con un gradiente de temperatura. La existencia de estas condiciones determina la formación de una gran cantidad de compuestos químicos que constituyen el humo del tabaco y entre otros se produce el uretano que tiene acciones carcinogénicas y mutagénicas. En este trabajo usando un modelo inmunológico con macrófagos alveolares (MA) se probaron los efectos dañinos del uretano sobre células del sistema inmune. Se demostró que los receptores para Fc de IgG y de C3b de los MA se bloquean con uretano a concentraciones de 0.001 a 10 mg/ml, dosis que inhiben la formación de rosetas con eritrocitos cubiertos con IgG (EIgG) y complemento (EC3b). Las concentraciones altas del uretano disminuyen la cantidad de EIgG y de EC3b por cada MA. Los resultados muestran que el uretano modifica la interacción entre el Fc de IgG y de C3b con los receptores correspondientes de los MA en una relación dependiente de la dosis y sugieren que la inmunoregulación a nivel pulmonar puede estar alterada.

Palabras clave: Tabaquismo - Uretano - Receptores Fc y C3b - Macrófagos

Summary

Cigarette smoking has been identified as the major causative factor in the development of pulmonary, cardio-vascular and cancer diseases. Inside a burning tobacco product, a large variety of chemical and physical processes occur in an oxygen-deficient, hydrogen-rich environment with a steep temperature gradient. The existence of these specific conditions greatly determines the formation of the vast majority of smoke components; one of them is urethane with carcinogenic and mutagenic actions. In the following study, an immunological model, employing alveolar macrophages, has been designed to assess the harmful effects of urethane. The present study demonstrates the effects of urethane on macrophage receptors (Fc and C3b receptors). Sheep erythrocytes (E) coated with rabbit anti-E IgG (EIgG) and with rat C3b (EC3b) were used for rosette test. Inhibitory activity of rosette formation was present with urethane concentrations from 0.001 to 10 mg/ml. It also decreased the number of EIgG and EC3b around alveolar macrophages. The results show that urethane modified interaction between Fc and C3b with their receptors on membrane of alveolar macrophages in dose-dependent fashion and suggest that immune regulation may be altered at pulmonary level.

Key words: Smoking - Urethane Fc and C3b receptors - Macrophages.

Introducción

La adicción al tabaco es un factor de riesgo que provoca alteraciones moleculares, celulares y tisulares en los individuos fumadores, las cuales están asociadas a diversas enfermedades, entre las que se encuentran la bronquitis crónica, el enfisema pulmonar y los tumores pulmonares^{1,2}.

El humo de tabaco afecta tanto a los fumadores "activos" como a los "pasivos"³, ya que el humo

contiene sustancias que inhiben los mecanismos de defensa del aparato respiratorio, produciendo parálisis del movimiento ciliar⁴, disminución de los linfocitos T cooperadores⁵ y cambios en la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (MA)⁶.

El uretano es una sustancia que se genera durante la combustión del tabaco y se encuentra presente en el humo del tabaco², tiene propiedades narcóticas,

antimitóticas, carcinogénicas y carcinoclasticas⁷ y junto con los otros componentes del humo pueden ejercer una acción sinérgica que afecte a los elementos de la respuesta inmune.

Se ha intentado establecer a qué niveles de la respuesta inmunológica están actuando los componentes del humo de tabaco y cuáles son las sustancias que producen una depresión de la respuesta inmune tanto celular como humoral^{8,9,10}, pero aún se requiere determinar la participación de cada uno de los compuestos y conocer cuáles son los más relevantes en la generación de las alteraciones. El uretano⁷ es un compuesto que por sus características bioquímicas y farmacológicas permite estudiar algunas de las fases de su relación con el sistema inmune y la asociación con padecimientos ligados con el tabaquismo; por ello se analiza el efecto de varias concentraciones del uretano sobre la capacidad de los receptores de macrófagos para unir a los ligandos del Fc de IgG y del C3b, evaluándose este proceso con la técnica de la formación de rosetas¹⁰.

Los resultados apoyan que las dosis altas de uretano (más de 15 mg/ml) son tóxicas para los MA; concentraciones intermedias (0.001 a 10 mg/ml) exhiben una relación dosis respuesta en la que la formación de rosetas⁵ disminuye por debajo del 5% y las dosis menores de 0.0001 mg/ml no modifican la interacción de los receptores de los MA con sus ligandos.

Material y métodos

Macrófagos alveolares (MA). Se emplearon 7 ratas Wistar para cada experimento (n=5), que fueron anestesiadas con éter y se les extrajo la sangre por punción cardíaca, para evitar la contaminación de los macrófagos alveolares con células sanguíneas, después se disecó la tráquea para introducir un catéter por el cual se aplicaron 10 ml de una solución reguladora salina-fosfato con un pH de 7.4, 0.15M (SRSF); se aspiró la solución y se repitió el procedimiento por tres veces manteniéndose la suspensión celular a 4°C. Los MA obtenidos de las siete ratas se mezclaron en un sólo tubo y se centrifugaron ajustándose a 1×10^6 células/ml con medio de cultivo TC-199 adicionado con gelatina (1 mg/ml), penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (50 ug/ml) (TC-199-gel-abs)¹⁰. Se permitió que los MA (2×10^5 células por preparación) se adhirieran al vidrio durante una hora a 37°C y se eliminaron las células no adherentes para mantener una población celular enriquecida con MA. Posteriormente se les añadió a los MA el uretano

(Sigma Chemical Co.), en dosis de 0.0001 a 10 mg/ml disuelto en TC-199-gel-abs, incubándolos por 15 min a 20°C; finalmente los MA se lavaron por tres veces con TC-199-gel-abs para eliminar el exceso del uretano.

Rosetas. Se prepararon eritrocitos de borrego sensibilizados con IgG anti glóbulos rojos (EIgG)¹¹ y con C3b de ratas (EC3b). Se ajustaron los EIgG y los EC3b al 1% y se colocaron junto con los MA durante 1 hora a 20°C. Se eliminaron los eritrocitos que no estuvieron unidos a los MA y las preparaciones se fijaron con etanol y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se contaron 300 células por cada una de las preparaciones agrupando a los MA con 2 o menos, EIgG o EC3b como negativos, las rosetas positivas tuvieron 3 eritrocitos/MA, 4 a 6/MA y aquellos MA con 7 o más eritrocitos (n=5).

Resultados

La cantidad de rosetas MA y EIgG, o EC3b, que fueron obtenidas en las preparaciones controles y que no estuvieron expuestas al uretano mostraron valores similares (Fig. 1). Además se observó que el mayor porcentaje de los MAEIgG tuvieron 7 o más EIgG por MA (Fig. 1D). Por otro lado los MAEC3b dieron porcentajes más altos de positividad con los MA que tenían entre 4 y 6 eritrocitos por célula (Fig. 1-C).

La dosis de uretano de 10 mg/ml disminuyó notablemente la cantidad de rosetas y la mayor parte de los MA tenían 3 eritrocitos/célula (Fig. 1-B). La disminución de la concentración del uretano permitió observar un incremento en la cantidad de rosetas (MAEIgG y MAEC3b) y con la dosis de 0.0001 mg/ml la distribución en el porcentaje y en el número de eritrocitos por MA fue parecida a la encontrada en los MA controles que no se trataron con el uretano (Fig. 1).

Los MA sometidos a las dosis mayores de 15 mg/ml de uretano presentaron múltiples vacuolas y ruptura de la membrana citoplásmica. Con las dosis de 0.01 a 0 mg/ml se observó un aumento en el número de vacuolas de acuerdo a la dosis, pero se conservó la membrana celular. Las cantidades menores de 0.001 mg/ml de uretano no modificaron las características morfológicas de los MA comparados con los MA controles que se procesaron solamente con TC-199-gel-abs sin uretano.

Discusión

La composición química de los productos derivados de la combustión del tabaco es compleja²,

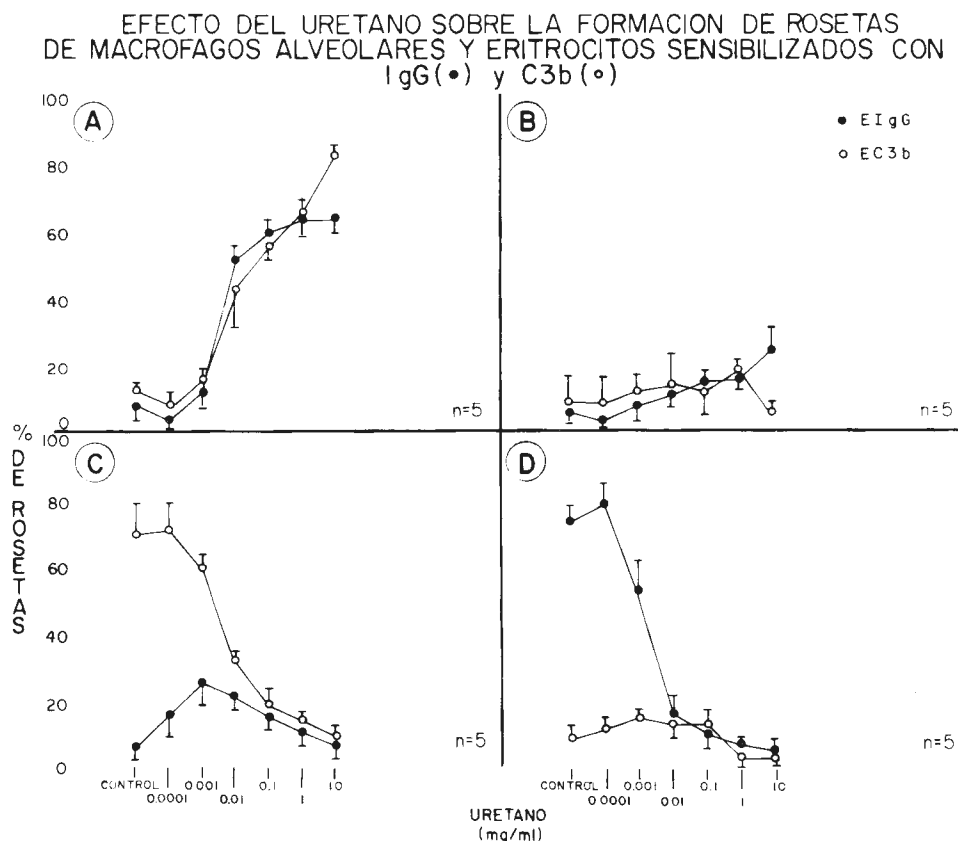


Fig. 1. A. Se señala el porcentaje de macrófagos alveolares (MA) que no formaron rosetas de acuerdo al incremento de la dosis de uretano (Φ = promedio y desviación estándar). B. Se muestra el porcentaje de rosetas positivas con 3 EIgG (●) ó 3 EC3b (○) por MA. C. Se indica el porcentaje de MA que tuvieron de 4 a 6 EIgG (●) ó 4 a 6 EC3b (○). D. Se observa el porcentaje de MA que formaron rosetas con 7 o más EIgG (●) ó EC3b (○) de acuerdo a la concentración del uretano. La formación de las rosetas entre MA y eritrocitos "vírgenes" (sin IgG ni C3b) fue menor del 5%. La escala de concentración de uretano en los paneles A y B es igual a la indicada en C y D

encontrándose ácidos, aldehídos, hidrocarburos y fenoles que son nocivos para los pulmones; además el formol, acetaldehído, acroleína, amonio y cianuro de hidrógeno son inhibidores del movimiento de los cilios del epitelio respiratorio^{4,6}. Los productos del tabaco que se ponen en contacto con los MA ocasionan cambios en su metabolismo y ultraestructura⁶. Las alteraciones son más importantes cuando los MA se incuban "in vitro" con los productos del tabaco, especialmente con el uretano, que a dosis mayores de 15 mg/ml son citotóxicas para los MA, y entre 0.01 a 10 mg/ml inhiben su capacidad para interactuar con el Fc de IgG y con C3b. Las dosis menores de 0.001 mg/ml no alteraron la competencia de los macrófagos para la formación de rosetas; sin embargo esto pudo deberse a que la duración de los experimentos fue corta y no se pudieron observar los cambios que ocurren a largo plazo con el comportamiento de los

MA. Con la dosis de 10 mg/ml se observó que la cantidad de rosetas para C3b fue menor (16%) que las correspondientes al Fc de IgG (35%) sugiriéndose que el receptor para C3b es más afectado por el uretano y que la acción de esta sustancia no es indiscriminada, puesto que el número de rosetas y la cantidad de eritrocitos (EIgG o EC3b) por MA fue diferente. Otra posibilidad es que el efecto dependiera de la afinidad entre los receptores pues es mayor para el Fc comparada con C3b, pero al analizar la cantidad de rosetas cuando los MA se incubaron con dosis menores de uretano se obtuvieron porcentajes similares de rosetas a los MA controles lo que descarta a la afinidad como la causa más importante de la disminución de rosetas inducida por el uretano.

La acción citotóxica de los productos del tabaco² debe tener un papel importante en la regulación de la

integridad de los receptores de membrana^{12,13}, o en el incremento o disminución de su cantidad^{12,13}. Además hay que considerar que cuando aumenta la cantidad de los MA puede tenerse una mayor eficiencia para eliminar agentes tóxicos, pero a la vez dichos productos pueden lesionar a los MA favoreciendo la liberación del contenido de sus lisosomas y, en lugar de servir como un mecanismo protector, las enzimas lisosomales dañaran al tejido pulmonar^{6,14}.

La cantidad de MA obtenida por lavado bronquial de los sujetos fumadores es mayor que en sujetos no fumadores, pero la viabilidad en ambos tipos de individuos es similar, debido a que "in vivo" hay otros factores que participan en la recuperación y estabilidad celular después de la exposición al humo del tabaco⁶.

La unión de los complejos antígeno-anticuerpo a los receptores para Fc de los macrófagos inician el proceso de la endocitosis, el reciclamiento de los receptores y de los ligandos unidos a ellos y activan el estallido respiratorio^{12,13}. Los procesos señalados son importantes para eliminar bacterias y células

tumorales. La unión del Fc y de C3b a los receptores correspondientes en la membrana de los MA desencadena una señal que produce cambios en el citoesqueleto y junto con el Ca²⁺ se estimula la fosforilación de la tirosina¹⁴. Las funciones inmunobiológicas señaladas son esenciales para mantener una respuesta inmune efectiva, la que se inicia por la unión del Fc de IgG¹² y del C3b¹³ a los receptores de los macrófagos, pero si esta fase es alterada o bloqueada por uretano, o cualquier otro de los productos del tabaco, se ocasionarán cambios en la inmunoregulación que pueden ser letales para el sujeto. Por otro lado se ha observado que los linfocitos T son inhibidos por el humo de tabaco y que las células presentadoras del antígeno conservan sus propiedades, pero esto ocurre en los ganglios linfáticos de los pulmones⁹. La exposición crónica al humo de tabaco inhibe la respuesta inmune mediada por linfocitos B¹⁰. El uretano bloquea la unión entre el Fc de IgG y de C3b con los receptores de la superficie de la membrana de los MA.

Agradecimientos: Beatriz García, apoyo técnico; Ma. Elena Ortíz, trabajo mecanográfico

Referencias

1. Martínez Rd, Moreno A. Presencia de IgA y de antígenos del tabaco en complejos inmunes circulantes de pacientes neumopatas. *Rev Alergia* 1992;39:106-12.
2. Martínez RD. Actividad genotóxica del humo del tabaco. *Bioquímica* 1993;18:35-42.
3. Lofroth G, Ling PI, Agurell E. Public exposure to environmental tobacco smoke. *Mutation Res* 1988;202:103-10.
4. Ballenger JM. Experimental effect of cigarette smoke on human respiratory cilia. *New Eng J Med* 1960;263:832.
5. Ginns LC, Goldenheim PD, Miller LG et al. T-lymphocytes subsets in smoking and lung cancer. *Am Rev Res Dis* 1982;126:265-9.
6. Harris J, Swenson E, Johnson J. Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization and ultrastructure in smokers and non smokers. *J Clin Invest* 1970;49:2086-96.
7. Bateman AJ. The mutagenic action of urethane. *Mutation Res* 1976;39:75-96.
8. Sopori ML, Cherian S, Chilukuri R and Shopp GM. Cigarette smoke causes inhibition of the immune response to intratracheally antigens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;97:489-99.
9. Chang JCC, Distler SG and Kaplan AM. Tobacco smoke suppresses T cells but not antigen-presenting cells in the lung-associated lymph nodes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;102:514-23.
10. Savage SM, Donalson LA, Cherian S, Chilukuri R, White VA and Sopori ML. Effects of cigarette smoke on the immune response. II Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;111:523-9.
11. Martínez RD and Ulloa S. Effect of extracellular products of *Streptococcus* on macrophage Fc receptor for IgG. *Allergol Immunopathol* 1986;14:183-8.
12. Van de Winkel JGJ, Capel PJA. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993;14:215-21.
13. Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) y CR2 (CD21). *Adv Immunol* 1989;46:183-219.
14. Fels AOS and Cohn ZA. The alveolar macrophage *J Appl Physiol* 1986;60:353-69.
15. Otha Y, Stossel TP, Hartwing JH. Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I. *Cell* 1991;67:275-82.