



ANORMALIDADES DE LA INMUNORREGULACIÓN EN EL PULMÓN DE FUMADORES

J. Bellmunt, S. Morales, R. Orriols*, J. de Gracia*, N. Tallada**, J.J. Ota*** y L.A. Solé

Servicio de Oncología Médica, *Sección de Neumología, **Servicio de Anatomía Patológica y ***Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Vall d'Hebrón. Barcelona

Los efectos del tabaquismo en la inmunidad celular local a nivel pulmonar a través del análisis del lavado broncoalveolar (LBA) no es bien conocido. Hemos investigado si los cambios celulares en el LBA producidos en fumadores puede relacionarse con el desarrollo de enfermedad neoplásica. Comparamos algunos parámetros celulares del LBA, incluyendo las subpoblaciones linfocitarias CD₄ y CD₈ por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales, en un grupo de 13 fumadores y 7 no fumadores.

El grupo de fumadores tiene una disminución significativa ($p < 0,001$) del número de linfocitos CD₄ en comparación con el grupo de no fumadores y una tendencia estadísticamente no significativa a un mayor número de linfocitos CD₈. Estos resultados conllevan a una inversión significativa ($p=0,001$) del índice CD₄/CD₈ en el grupo de fumadores.

Nuestros resultados indican la presencia de una inmunodepresión local secundaria. Esta situación puede predisponer a un mayor riesgo de desarrollo de neoplasias y de infecciones respiratorias en fumadores.

Arch Bronconeumol 1990; 26: 288-291

Introducción

El riesgo de adquirir cáncer de pulmón es de 30 a 50 veces superior en la población de fumadores con respecto a la de no fumadores. No obstante, siguen sin conocerse como el fumar predispone a un individuo a desarrollar cáncer¹. Parece existir una cierta predisposición genética a los efectos patobiológicos del humo del cigarrillo^{2,3} así como otros factores que aumentan la susceptibilidad en el huésped por el momento desconocidos, o quizás, la simple casualidad⁴.

El humo del cigarrillo es una compleja mezcla de gases y partículas que contiene alrededor de 3.000 constituyentes incluyendo a productos de naturaleza química, metales y radionucleos, muchos de los cuales son citotóxicos y carcinogénicos⁵.

Junto a su efecto carcinogénico intrínseco, se ha sugerido que la supresión de la respuesta inmune por

Immunoregulation abnormalities in smokers lungs

The effects of smoking upon BAL (bronchoalveolar lavage) cellular profiles are not well known. We investigated the cellular changes in BAL, that could be secondary to tobacco smoking and their relationship to the development of cancer. To that end, we compared several cellular parameters of BAL, including the analysis of T-lymphocytic subpopulation CD₄ and CD₈ by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies, in a group of 13 smokers and 7 nonsmokers.

The group of smokers had a significantly decreased ($p < 0,001$) number of CD₄ lymphocytes in comparison with the nonsmoker group, and a non statistically significant tendency to higher numbers of CD₈ lymphocytes. These results led to a significant inversion ($p = 0,001$) of the CD₄/CD₈ ratio in the group of smokers.

Our findings indicate the presence of a secondary local immunosuppression. This situation could predispose to the subsequent development of tumor and to a higher risk of respiratory infections in smokers.

los productos del tabaco sería un evento importante en la génesis de las enfermedades malignas asociadas al consumo de cigarrillos^{1,6,7}.

El análisis de la inmunidad celular local a nivel pulmonar a través del LBA en fumadores, puede contribuir a un mejor conocimiento del papel del tabaco como inmunosupresor local y a la comprensión de su papel patogénico en el desarrollo posterior de neoplasias e infecciones, presentes con mayor frecuencia en la población fumadora. Se desconoce con exactitud la repercusión del tabaquismo en los perfiles celulares obtenidos en el LBA en las diferentes patologías pulmonares y son escasos los trabajos en la literatura que han analizado este hecho. La amplia extensión del hábito tabáquico obliga a un análisis detallado de esta repercusión.

Se presenta una valoración de los defectos existentes de la inmunorregulación local en el LBA en pacientes fumadores y no fumadores a través del estudio de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

Recibido el 15-2-1990 y aceptado el 20-3-1990



Material y métodos

Se han analizado muestras del lavado broncoalveolar (LBA) de un total de 20 pacientes, de los que 13 eran fumadores y 7 eran no fumadores. En todos los pacientes la zona lavada y el resto del parénquima estaban libres de enfermedad activa, por observación broncoscópica, examen citológico, bacteriológico o por estudio de seguimiento posterior.

Los valores en sangre periférica de todos los pacientes, incluyendo hemoglobina, los leucocitos totales y el porcentaje de linfocitos y de monocitos se hallaban dentro de los límites normales. Se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes con antecedentes en el periodo precedente de un mes de infección viral o bacteriana. El LBA fue efectuado entre las 10 y las 13 horas de la mañana desde marzo de 1986 a marzo de 1988.

Los lavados se efectuaron en posición de decúbito supino con un fibrobronoscopio Olympus BF-B3R. Tras anestesia de la cavidad oral con lidocaína 2% en spray y de la fosa nasal con clorhidrato de tetracaína en pomada hidrosoluble se procedía tras la introducción por vía nasal, a la revisión broncoscópica habitual del árbol respiratorio. La anestesia de la vía respiratoria alta se efectuó con 5 ml de lidocaína al 2% administrada a través del broncofibroscopio. Se efectuaba toma de muestras histológicas de todas las lesiones sospechosas cuando ello era necesario.

Se utilizaron alíquotas de 50 cc de suero fisiológico 0,9% a temperatura ambiente que fueron instiladas e inmediatamente recuperadas mediante aspiración manual con una jeringa de 50 cc. La succión se efectuó con control visual hasta que cesó el retorno de líquido o hasta que se observaba colapso bronquial. Se utilizó un promedio de tres alíquotas de 50 cc en cada procedimiento. El líquido del lavado fue también examinado para detectar la presencia de bacilos alcohol-ácido resistentes y hongos, tanto en extensiones como con técnicas de cultivo.

Procesamiento del líquido obtenido del LBA

El líquido de lavado fue filtrado a través de dos capas de gasa quirúrgica para extraer el moco, colocado en tubos Falcon de 50 ml y alojados en refrigeración a 4 °C hasta que fueron centrifugados. La centrifugación se efectuó en una centrifuga refrigerada a 4 °C, 1.500 rpm durante 15 min. El líquido sobrenadante fue almacenado a -70 °C para posteriores estudios bioquímicos. El botón celular resultante fue resuspendido en 2 cc de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biomérieux). Se efectuó el recuento celular total a partir de la suspensión tamponada mediante un hemocitómetro de Neubauer. El recuento celular diferencial se efectuó a partir de extensiones obtenidas por citocentrifugación y posterior tinción con Papanicolaou. Para la obtención de las cifras de recuento celular diferencial se contaron un mínimo de 200 células por porta. Todos los líquidos obtenidos se procesaron en el transcurso de las 12 horas siguientes al proceso de obtención manteniéndose a 4 °C. Se efectuó análisis de la viabilidad celular mediante el test de exclusión con azul Tripán, previo al procesamiento, desechándose aquellos lavados con viabilidad inferior al 70%.

En algunos líquidos de lavado broncoalveolar que presentaban una alta proporción de células macrofágicas, se procedió previo al marcaje celular con AcMc, a la purificación de células mononucleadas, incubando en rotación a la suspensión celular con partículas de hierro opsonizables y suero humano durante una hora a 37 °C. Se extraía la solución enriquecida de linfocitos, mediante la aplicación de un campo magnético que retenía las células fagocíticas.

Los linfocitos CD₃ (linfocitos T maduros), las subpoblaciones CD₄ (colaboradora/inductora) y CD₈ (supresora/citotóxica) así como el marcador de las células de Langherhans CD₁a (OKT6), se cuantificaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron en el presente estudio anticuerpos monoclonales procedentes de Ortho Diagnostics System Inc. Se ajustó la concentración celular de linfocitos a 5×10^5 células en un volumen de 100 µl de medio de Hank's y se colocaron en un baño de agua-hielo (0 °C-4 °C).

Se añadió 10 µl de solución de anticuerpo monoclonal reconstituido a la suspensión contenida en un tubo de ensayo, mezclando bien e incubando la solución en un baño de agua-hielo durante 30 minutos.

Se realizó tras esta incubación un primer lavado con 5 ml de medio de lavado PBS (phosphate buffered saline) frío, centrifugando las células a $300 \times g$ durante 10 minutos (a 4 °C) decantando seguidamente el sobrenadante.

TABLA I
Proporciones de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, además del porcentaje de linfocitos CD₄ y CD₈ e índice CD₄/CD₈ para el grupo de pacientes no fumadores

No fumadores	N.º	X ±	DE	Rango
Células totales (mill cel/100 ml)	7	7,9	2,1	4,7-12,0
Macrófagos	7	77,7	12,5	61,8-92,5
Linfocitos	7	17,0	9,5	7,0-30,5
Neutrófilos	7	5,2	3,3	0,5- 8,7
Eosinófilos	7	0,0	0,0	0,0- 0,0
Linfocitos CD ₄	7	51,3	6,6	38,4-63,1
Linfocitos CD ₈	7	33,1	5,6	26,0-45,8
Índice CD ₄ /CD ₈	7	1,6	0,3	0,8- 2,1

TABLA II
Proporciones de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, además del porcentaje de linfocitos CD₄ y CD₈ con el índice CD₄/CD₈ para el grupo de pacientes fumadores

Fumadores	N.º	X ±	DE	Rango
Células totales (mill cel/100 ml)	12	19,3	7,2	4,4-42,1
Macrófagos	12	90,9	3,1	81,0-97,4
Linfocitos	12	5,7	2,6	0,1-18,5
Neutrófilos	12	3,0	2,0	0,0-10,4
Eosinófilos	12	0,0	0,0	0,0- 0,0
Linfocitos CD ₄	12	25,8	10,1	6,7-61,4
Linfocitos CD ₈	12	45,1	10,5	18,7-71,4
Índice CD ₄ /CD ₈	11	0,6	0,2	0,1- 1,4

Se añadieron 5 cc de medio de cultivo RPMI-1640 con las mismas adiciones citadas anteriormente y se realizó un segundo lavado de las células mediante centrifugación a $300 \times g$ durante 10 minutos (a 4 °C), decantando cuidadosamente el sobrenadante para no alterar la suspensión celular, y dejando aproximadamente un volumen de 100 µl en cada tubo.

Se añadió seguidamente 10 µl de inmunoglobulina de conejo anti-Ig de ratón (RAM) (Nordic Immun Lab) marcada con fluoresceína y se realizó una segunda incubación en baño de agua-hielo durante 30 minutos.

Se efectuaron dos nuevos lavados en PBS en centrifuga refrigerada a 4 °C $300 \times g$ durante 10 minutos.

Se procedió finalmente al análisis en microscopio de fluorescencia equipado con epifluorescencia, utilizando un filtro excitador BG-12 y un filtro de barrido de 530 nm, contando más de 50 células, dando el porcentaje en número de células positivas (marcadas fluorescentemente).

Las pruebas estadísticas aplicadas fueron la comparación de porcentajes, medias, desviación estándar, la prueba de chi cuadrado y la t de Student. El nivel de significación estadística se cifró en el 5%.

Resultados

El volumen medio de líquido de lavado procesado para el análisis celular fue de 42,1 ml, con una desviación estándar de 2,1 ml. Los valores medios, desviaciones estándar y rango del contaje total de células (en células por 100 ml) macrófagos, linfocitos, polimorfonucleares y eosinófilos, así como de linfocitos CD₄, CD₈ y los valores del índice para ambos grupos se detallan en las tablas I y II.



Destaca un aumento en las cifras del recuento celular total en el grupo de fumadores que llega a ser el doble con respecto a las cifras de recuento celular total en el grupo de no fumadores (diferencia estadísticamente significativa).

El análisis de la diferencia entre porcentajes celulares, muestra una tendencia a un aumento en el porcentaje de macrófagos y una tendencia a un menor porcentaje en la cifra de linfocitos en el grupo de pacientes fumadores al ser comparados con el grupo de pacientes no fumadores. Esta diferencia no llega a tener significación estadística.

Los porcentajes de polimorfonucleares y de eosinófilos no difieren significativamente entre ambos grupos.

En el subgrupo de pacientes fumadores observamos una menor proporción de células con fenotipo CD₄⁺ (linfocitos T colaboradores) en comparación con el subgrupo de pacientes no fumadores que es estadísticamente significativa.

Aunque el subgrupo de pacientes fumadores experimentan una clara tendencia a presentar un porcentaje de células CD₈⁺ (linfocitos T citotóxico/supresores) superior al subgrupo de pacientes no fumadores, esta diferencia no llega a la significación estadística ($p = 0,07$).

Los resultados precedentes conducen a que los pacientes fumadores experimenten una marcada inversión en el índice CD₄/CD₈ con respecto a los pacientes control no fumadores ($p = 0,001$).

Discusión

Existen numerosos estudios que demuestran que el tabaco puede conducir a alteraciones en la respuesta inmune⁸⁻¹⁰. Entre las alteraciones halladas destacan el aumento de los linfocitos en sangre periférica^{8, 9, 11, 12} o la formación de precipitinas séricas contra antígenos del tabaco^{13, 14}. Estudios en sangre periférica de la respuesta linfocitaria a mitógenos en fumadores, aportan resultados contradictorios^{10, 15}.

Estudios fenotípicos no han hallado en cambio, diferencias en el porcentaje de células NK entre fumadores y no fumadores tanto en sangre periférica como en lavado broncoalveolar⁸.

El análisis de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica ha mostrado una disminución del porcentaje de células T CD₄⁺, con disminución del cociente colaborador/supresor en grandes fumadores⁶.

Los valores medios referidos en la literatura del porcentaje de linfocitos en controles no fumadores oscila de 1 a 20 %. Esto ha sido atribuido por algunos al uso de pacientes control en lugar de voluntarios sanos¹⁶. Algunos estudios colocan el umbral de normalidad en el 14-15 %, considerando la presencia de alveolitis linfocitaria cuando la cifra de linfocitos supera el 18 %^{16, 17}. La cifra media de nuestro estudio es 17,0 ± 9,5 %^{7, 8}. El hallazgo de cifras de linfocitosis de hasta el 30 % puede venir justificado, a parte del hecho de ser "pacientes" control, a fluctuaciones "espontáneas" de los porcentajes en gente normal¹⁶.

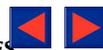
El patrón normal de subpoblaciones linfocitarias en el líquido de lavado es similar al visto en sangre periférica con un 60-70 % de células T y un 5-10 % de células B. El índice CD₄/CD₈ es de 1,6, siendo el porcentaje de células CD₄⁺ de 46 ± 3 % y el porcentaje de CD₈⁺ de 25 ± 2 %¹⁹. En nuestro estudio hemos hallado unos valores de CD₄ de 51 ± 6 % (38-63) de CD₈ de 33 ± 5 % (26-45) y un índice de 1,6 ± 0,3 (0,8-2,1). Estas cifras son similares a las halladas en la literatura.

En el grupo de pacientes fumadores destaca un aumento en la media del recuento celular total (RCT) (19 ± 7 mill cel/100 cc) que llega a ser de hasta el doble al compararlo con el grupo de no fumadores. Este aumento en el RCT puede llegar a ser de hasta cuatro veces superior al RCT hallado en individuos no fumadores^{8, 20-23}, siendo básicamente a expensas de un aumento absoluto del número de macrófagos¹⁸ según se desprende de los datos de la literatura.

La influencia del tabaquismo sobre la inmunidad celular local en el pulmón viene no solo reflejada por las alteraciones en las poblaciones celulares del LBA, sino también en desequilibrios de las subpoblaciones linfocitarias residentes en el medio ambiente alveolar. Detectamos en nuestros pacientes fumadores una disminución significativa de la subpoblación CD₄⁺ (inductora/colaboradora), que sugeriría una situación de inmunosupresión secundaria local, la cual podría ser condicionante del desarrollo posterior de tumores y de la mayor incidencia de sobreinfección respiratoria en este grupo de enfermos. Asimismo, hemos observado una clara tendencia a un mayor porcentaje de células con fenotipo CD₈⁺ (citotóxico/supresor). Estos hallazgos han conducido a una marcada inversión del índice CD₄/CD₈ (0,6 ± 0,2 [0,1-1,4]).

Existen escasos estudios en la literatura que hayan analizado las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias del LBA inducidas por el tabaco. Así, se ha citado la existencia de un porcentaje disminuido de células CD₄⁺ (colaboradoras) y un aumento en el porcentaje de células CD₈⁺ (supresoras/citotóxicas) resultando en una marcada disminución del cociente CD₄/CD₈ al compararlo con individuos no fumadores⁸. Otros han hallado resultados similares con aumento de la población CD₈ e inversión del índice aunque sin alteraciones en la población inductora/colaboradora²⁴.

Además del efecto carcinogénico intrínseco, se ha sugerido que la supresión de la respuesta inmune por los productos del tabaco, sería un evento importante en la génesis de las enfermedades malignas asociadas al consumo de cigarrillos^{1, 6}. El aumento en el número de macrófagos, asociado al consumo de tabaco es probable que actúe de forma inhibitoria sobre otras funciones inmunes celulares²⁵. Estudios inmunitarios efectuados en el lavado broncoalveolar de individuos fumadores han detectado una disminución de la respuesta linfocitaria frente a mitógenos, sugiriendo que el humo del cigarrillo a través de factores inhibidores o por aumento de poblaciones supresoras, empeora las defensas inmunitarias locales²⁶. Estos hallazgos serían consistentes con la observación de un aumento



de linfocitos T CD8+ en los espacios alveolares de pacientes fumadores⁸. Este aumento de la proporción de células supresoras ha sido atribuido a una reacción de hipersensibilidad pulmonar frente a los productos del tabaco o bien a infecciones virales repetidas y persistentes en el tracto respiratorio inferior. Se sabe por estudios experimentales, que estas células supresoras y sus mediadores, pueden inhibir las respuestas antitumorales del huésped contra el crecimiento tumoral^{15,27}. Así, el aumento de la actividad celular supresora junto a otros trastornos de la inmunorregulación en fumadores pueden jugar un papel en el desarrollo de sobreinfecciones respiratorias, de bronquitis crónica y de carcinomas asociados con el tabaquismo.

Concluimos que en los pacientes fumadores, la disminución de la subpoblación CD₄ y la tendencia a una mayor proporción de células CD₈ sugieren una situación de inmunosupresión secundaria local que podría ser condicionante de la mayor predisposición al desarrollo posterior de tumores y de la mayor incidencia de sobreinfección respiratoria en este grupo de enfermos.

Es probable que el aumento absoluto de las cifras de macrófagos en la población fumadora, o de sustancias tóxicas derivadas del humo del cigarrillo o del metabolismo celular, interfieran, influyan o inhiban algunas funciones inmunes celulares y sean responsables de las alteraciones halladas en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ginns LC, Ryu JH, Rogol PR, Sprince NO, Oliver LC, Larson CJ. Natural killer cell activity in cigarette smokers and asbestos workers. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:831-834.
2. Mulvihill JJ. Host factors in human lung tumors: an example of ecogenetics in oncology. *JNCI* 1976; 57:3-7.
3. Lynch HT, Kimberling WJ, Markwicka SE. Genetics and smoking-associated cancers: A study of 485 families. *Cancer* 1986; 57:1640-1646.
4. Harris CC. Tobacco smoke and lung disease: Who is susceptible? *Ann Intern Med* 1986; 105:607-608.
5. US Public Health Service. The health consequences of smoking: Cancer. A report of the general surgeon. Rockville, Maryland: Department of Health and Human Services; 1982.
6. Ginns LC, Goldenheim PD, Miller LG et al. T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:265-269.
7. Penn I, Starzl TE. Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation* 1972; 14:407-409.
8. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90:39-44.
9. Miller LG, Goldstein G, Murphy M, Ginns LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking: Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest* 1982; 82:526-529.
10. Petersen BH, Steimel LF, Callaghan JT. Suppression of mitogen-induced lymphocyte transformation in cigarette smokers. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 27:135-140.
11. Howell RW. Smoking habits and laboratory tests. *J Lab Clin Med* 1970; 2:152-153.
12. Yeung MC, Buncio AD. Leukocyte count, smoking and lung function. *Am J Med* 1984; 76:31-37.
13. Chu YM, Parlett RC, Wright GL. A preliminary investigation of some immunological aspects of tobacco use. *Am Rev Respir Dis* 1970; 102:118-123.
14. Panayatopoulos S, Gotsis N, Papazoglou N, Concouris L. Antigenic study of nicotiana tabacum and research on precipitins against tobacco antigens in the serum of smokers and nonsmokers. *Allergol Immunopathol* 1974; 2:111-116.
15. Fujimoto S, Greene MI, Schon AH. Regulation of the immune response to tumor antigens: I, immunosuppressor cells in tumor-bearing host. *J Immunol* 1976; 116:791-799.
16. Laviolette M. Lymphocyte fluctuation in bronchoalveolar lavage fluid in normal volunteers. *Thorax* 1985; 40:651-656.
17. Baughman R, Strohofer S, Kurtis Kim C. Variation of differential cells counts of bronchoalveolar lavage fluid. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:341-343.
18. Crystal RG, Reynolds HY, Kalica AR. Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. *Chest* 1986; 90:122-131.
19. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, Rossman MD. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 1985; 102:93-108.
20. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84:559-573.
21. Martin TH, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effect of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:254-260.
22. Warr GA, Martin R, Holleman CL, Criswell BS. Classification of bronchial lymphocytes from nonsmokers and smokers. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113:96-100.
23. DeShazo RD, Banks DE, Diem JE et al. Bronchoalveolar lavage cell-lymphocyte interactions in normal nonsmokers and smokers. Analysis with a novel system. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:545-548.
24. Bello S, Vila M, Lasierra P, Larrad L, Roche P, Hernandez A. Alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias en el lavado broncoalveolar de fumadores. *Arch Bronconeumol* 1988; 24(supl):33.
25. Weissman DN, De Shazo RD, Banks DE. Modulation of natural killer cell function by human alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78:571-577.
26. Daniele RP, Dauber JH, Altose MD, Rowlands DT, Gorenberg DJ. Lymphocytes studies in asymptomatic cigarette smokers. A comparison between lung and peripheral blood. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116:997-1005.
27. Treves AJ, Carnaud C, Trainin N, Feldman M, Cohen IR. Enhancing T lymphocytes from tumor-bearing mice suppress host resistance to syngeneic tumour. *Eur J Immunol* 1974; 4:722-727.