

ALTERACIONES ALVEOLO-INTERSTICIALES EN EL FUMADOR PASIVO. MODELO MORFOMETRICO EXPERIMENTAL

A.I. Maurain Viloría, J. de D. Escolar Castellón, M.D. Ariño Matín, P. Miñana Amada, E. Prats Rivera* y P. Roche Roche.

Departamento de Ciencias Morfológicas. *Servicio de Medicina Nuclear. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

Se ha realizado un modelo experimental de fumador pasivo exponiendo a ratas al humo de 10 cigarrillos al día/dos meses. Paralelamente se estableció un grupo control. El estudio ha sido fundamentalmente morfológico, dividiendo los hallazgos en: a) citológicos del lavado broncoalveolar (LBA) (linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares); b) morfométricos (hiperinflación pulmonar, engrosamiento septal, hemosiderina, área linfática, epitelio en contacto (Ep C), epitelio plano (Ep P) y alveolos ocupados y c) isotópicos (captación de Ga^{67} por el pulmón y cociente pulmón/hígado). El LBA presentó un aumento significativo de linfocitos ($\bar{x} = 27,1\%$) y polimorfonucleares ($\bar{x} = 5,6\%$) ($p < 0,001$). El estudio morfométrico mostró un aumento de todas las variables, que fue significativo ($p < 0,01$) a excepción del engrosamiento septal. La captación de Ga^{67} fue menor en los pulmones de los animales expuestos a humo de tabaco, habiendo diferencias significativas en el cociente P/H. Se concluye que la exposición de forma pasiva a humo de tabaco produce alteraciones alveolo-intersticiales similares a las descritas en los modelos experimentales en rata de fumador activo.

Alveolo-interstitial alterations in passive smoking. Morphometric experimental model

A passive smoking experimental model was designed by exposing rats to the smoke of 10 cigarettes/day for 2 months. A control group was established parallel to the former. This study consisted chiefly of measurement of morphologic parameters which were divided into: a) cytologic parameters at bronchoalveolar lavage (lymphocytes, macrophages and polymorphonuclears); b) morphometric parameters (hyperinflation of the lung, septal thickening, deposition of hemosiderin, lymphatic area, epithelium in contact, flat epithelium, and occupied alveoli); and c) isotopic parameters (pulmonary uptake of 67 Gallium and lung/liver ratio). Bronchoalveolar lavage revealed a significant increase in the number of lymphocytes ($\bar{x} = 27.1\%$) and polymorphonuclears ($\bar{x} = 5.6\%$) ($p < 0.001$). The morphometric study disclosed an increase in all variables which was significant ($p < 0.01$) except for septal thickening. The 67 Gallium uptake was lower in the lungs of the animals exposed to tobacco smoke and there were significant differences in liver/lung ratio. It is concluded that passive exposure to tobacco smoke produces alveolo-interstitial alterations which are similar to those reported in experimental models of active smoking in rats.

Arch Bronconeumol 1989; 25: 3-9

Introducción

La literatura médica ha tratado el tema del tabaco desde el punto de vista experimental, desarrollando modelos de fumadores activos en diferentes animales. Sneider et al¹, en 1986 realizaron una revisión bibliográfica en la que se concluía con la existencia de una relación causa efecto entre humo de tabaco y enfisema pulmonar, en los animales de mediano y gran tamaño. En los roedores sin embargo, sólo se ha podido demostrar una alteración intersticial inespecífica. Toda la literatura experimental revisada plantea modelos estandarizados en los que se quiere normalizar diferentes factores que puedan influir sobre el resultado final del experimento como:

— El tipo de tabaco: el más utilizado es el proporcionado por el instituto de Tabaco y Salud de Kentucky^{2,3}. Otros emplean cigarrillos comerciales sin filtro, no existiendo unanimidad entre ellos en relación al contenido de alquitrán ni de nicotina^{4,6}.

— La dosis está referida en «fumaradas» (*puffs*): cada fumarada dura 2 segundos y tiene un volumen determinado para cada animal en función del peso: 35 ml para la rata^{3,4,6} y 10-35 ml para los ratones y hamsters^{2,7}. El número de ellas e intervalo está en relación con el objetivo del trabajo.

— La fumarada obliga a un tipo especial de administración, que se realiza con máquinas más o menos complejas, de las que hemos podido diferenciar en la literatura cuatro modelos diferentes^{2,5,6,8}. Esta técnica convierte al animal en un fumador activo de forma involuntaria, ya que se le obliga a permanecer inmóvil, con el rostro dirigido hacia la fuente de humo.

— Aunque no se le haya dado mucha importancia, consideramos muy interesante la longitud y calibre de la vía aérea de cada animal, ya que esto puede condicionar la permanencia del humo de tabaco en el pulmón.

Paralelo a esto, la experiencia clínica está poniendo de manifiesto la importancia de la patología pulmonar por la inhalación de humo⁹⁻¹⁴. En nuestra opinión personal, consideramos prioritario el estudio de las consecuencias del humo de tabaco en el fumador pasivo, ya que el activo se admi-

Recibido el 6-4-1988 y aceptado el 5-10-1988.

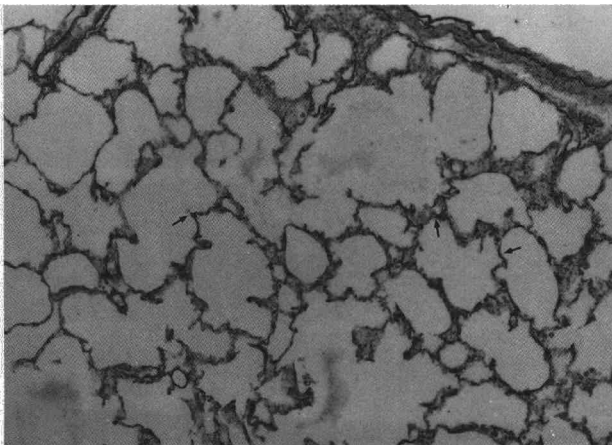
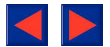


Fig. 1. Tinción de orceína. Animal expuesto a humo de tabaco. Hiperinsuflación alveolar. Conservación de las fibras elásticas (flechas). (x 100).

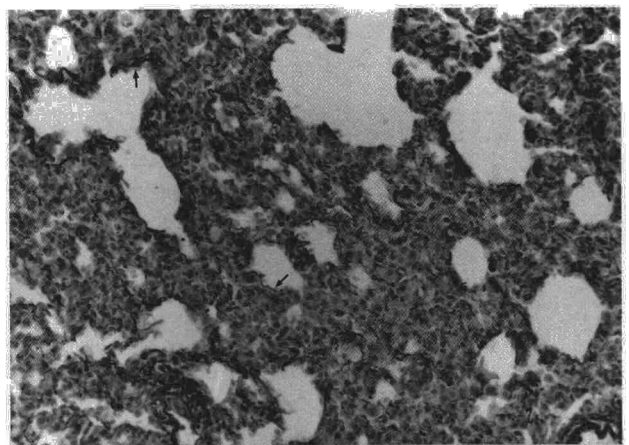


Fig. 2. Tinción de orceína. Animal expuesto a humo de tabaco. Engrosamiento septal con disminución de fibras elásticas (flechas) y pérdida de la arquitectura normal pulmonar. (x 200).

nistra el humo de tabaco voluntariamente, por lo que ante una precariedad de medios y conocimientos ha de ser objetivo primario el fumador pasivo.

En la revisión bibliográfica realizada no se ha podido encontrar ningún modelo experimental de fumador pasivo y la clínica referente a esta patología resulta un tanto ambigua. En este trabajo se propone un modelo morfológico de fumador pasivo, realizado de forma experimental en pulmón de rata, introduciendo a los animales en una atmósfera producida por la combustión de cigarrillos comerciales. Para el análisis objetivo de los resultados, todas las variables se cuantificaron, dividiéndose en: a) variables de lavado broncoalveolar (LBA), b) morfométricas (alveolointersticiales y bronquiales) y c) isotópicas (Ga^{67}).

Material y métodos

Se han utilizado 60 ratas Wistar, machos y hembras, en las que no se observó ningún tipo de patología, de edades comprendidas entre 4 y 8 meses, divididas en dos grupos:

1. Grupo control: 30 animales a los que no se les realizó ningún tipo de tratamiento.

2. Grupo expuesto a humo de tabaco: 30 animales que fueron sometidos de forma pasiva a una atmósfera producida por la combustión de 10 cigarrillos al día / durante 8 horas / 5 días a la semana / dos meses. La exposición a humo de tabaco se realizó introduciendo a los animales en las jaulas de medidas interiores $25 \times 35 \times 57$ cm, con dos orificios, conectados uno con el exterior, y otro a un cigarrillo unido a una fuente de aire continuo. El sacrificio se realizó a continuación de la exposición al último cigarrillo.

Durante el experimento, todos los animales permanecieron a una temperatura continua de 20° , descansando en viruta de madera previamente tamizada y fueron alimentados con piensos comerciales y agua «ad libitum»; 48 horas antes del sacrificio, se les inyectó una dosis de 25 microcurios de citrato de Ga^{67} por vía intraperitoneal. Previa anestesia con nembutal, se practicó un orificio de traqueotomía por el que se introdujo un catéter (venocat del n.º 18) hasta el pulmón derecho. A la cavidad torácica se accedió a través de dos incisiones medioclaviculares y se extrajo el pulmón izquierdo previa ligadura de su pedículo, para el procesado en microscopía óptica. En el pulmón derecho se efectuó el lavado broncoalveolar (LBA) introduciendo 1 ml de suero fisiológico, que se extrajo a continuación. Esta maniobra se repitió 4 veces. El líquido obtenido (84 % del perfundido) se centrifugó y el sedimento se tiñó con Giemsa para el conteo porcentual de linfocitos (L), macrófagos alveolares (MA) y polimorfonucleares (PMN).

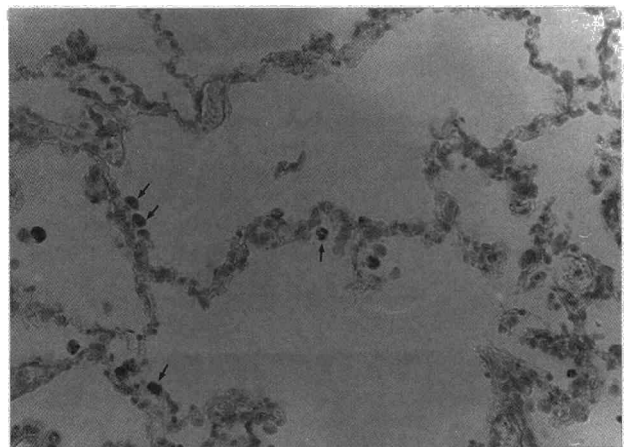


Fig. 3. Azul de Prusia. Animal expuesto a humo de tabaco. Macrófagos con hemosiderina en su interior (flechas). (x 400).

Un gramo de pulmón derecho y un gramo de hígado se introdujeron en una cámara de pozo para el conteo de captación de Ga^{67} . Con el propósito de eliminar las influencias debidas al LBA realizado con anterioridad, se hizo conteo de Ga^{67} en el líquido del LBA, no detectando emisión de radiación con la cámara de pozo. Tampoco se obtuvo correlación estadística entre el líquido del LBA recuperado y la captación de Ga^{67} en el pulmón.

El pulmón izquierdo, previa fijación por perfusión intratraqueal (25 cm de H_2O de presión) en formalina tamponada al 10 % durante 48 horas, se deshidrató por pases sucesivos en alcoholes de grado creciente, se incluyeron los bloques de parafina, que se cortaron a 5 micras y se contrastaron con tricómico de Martins, PAS, orceína y azul de Prusia de Pearl.

Cuantificación de las variables: Para una mejor sistematización las variables a estudiar se han dividido en:

a) Citológicas del LBA.

b) Morfométricas: una vez contrastados los cortes, se dibujaron con ayuda de una cámara clara, localizando en el tejido las siguientes variables:

1. Hiperinsuflación pulmonar: cuando la superficie de las cavidades aéreas alveolares estaba aumentada, sin que ello implique una pérdida de elastina (fig. 1).

2. Engrosamiento septal: aumento del grosor de los septos alveolares a expensas de células y material extracelular con desestructuración pulmonar (fig. 2).

3. Hemosiderina: superficie pulmonar con células positivas a la reacción de azul de Prusia (fig. 3).

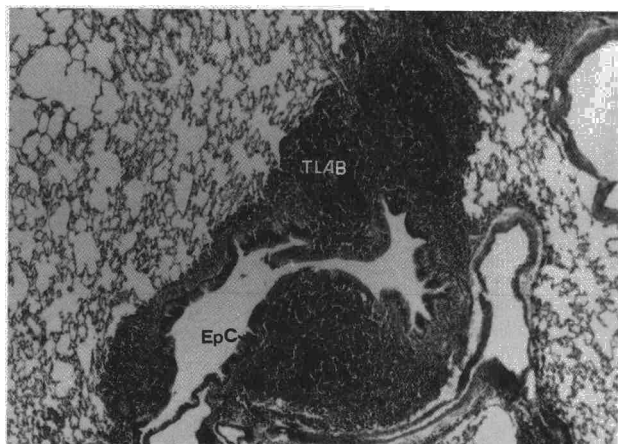
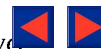


Fig. 4. Tinción de PAS. Animal expuesto a humo de tabaco. Imagen de un tejido linfático asociado al bronquio (TLAB) que compromete casi todo el epitelio bronquial. Epitelio en contacto (Ep C). (x 50).

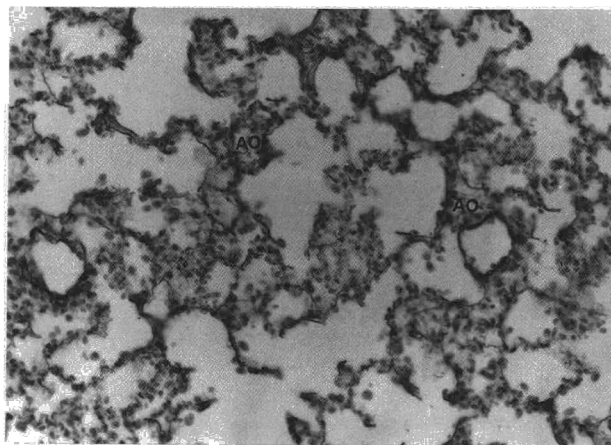


Fig. 6. Tinción de orceína. Animal expuesto a humo de tabaco. Alveolos ocupados (AO). Conservación de la estructura normal pulmonar. (x 300).

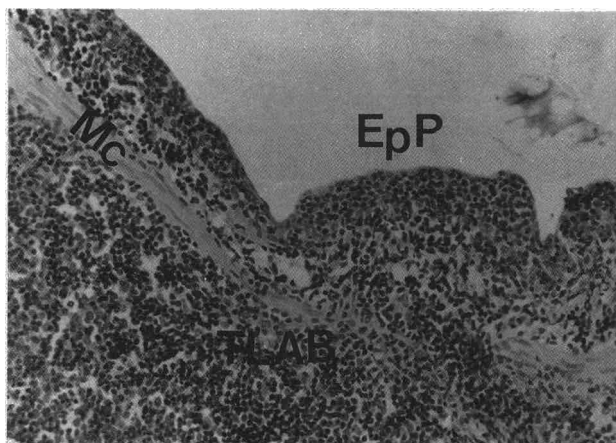


Fig. 5. Tinción de Martins. Animal expuesto a humo de tabaco. Epitelio plano (Ep P) de un tejido linfático asociado al bronquio (TLAB) con ausencia de células mucosas y cilios en su polo luminal. Muscular bronquial (Mc). (x 200).

4. Área linfática: superficie pulmonar ocupada por linfocitos pertenecientes al «tejido linfático asociado a los bronquios» (TLAB) (fig. 4).

Todas estas variables se expresaron en fracción porcentual de la superficie de tejido pulmonar estudiado.

5. Epitelio en contacto (EpC): longitud de epitelio bronquial en contacto con el área linfática (A. Linf.) del TLAB (fig. 4).

6. Epitelio plano (EpP): longitud de epitelio bronquial relacionado con el TLAB, que presenta células planas con ausencia de secreciones y cilios (fig. 5).

Estas dos últimas variables se expresaron en valores absolutos y en mm y junto con el área linfática constituyen las variables bronquiales. Para la cuantificación de estas 6 primeras variables, los dibujos se introdujeron en un ordenador Macintosh, utilizando los programas Mac Draft® y Mac Space®.

7. Alveolos ocupados: ocupación total o parcial de la luz alveolar por sustancias poco afines a los colorantes. No hay desestructuración de la arquitectura normal pulmonar (fig. 6). El conteo de alveolos fue porcentual con respecto al total.

c) Isotópicas: Se estudió la captación de Ga⁶⁷ en el pulmón derecho y la relación Pulmón/Hígado, con el fin de poder descartar posibles influencias no controladas.

Estudio estadístico: Todos los valores obtenidos, al no presentar en su mayoría una distribución normal, se compararon estadísticamente con el test no paramétrico de la U de Mann Withney¹⁵. Se consideraron valores estadísticamente significativos cuando la p era menor de 0,05.

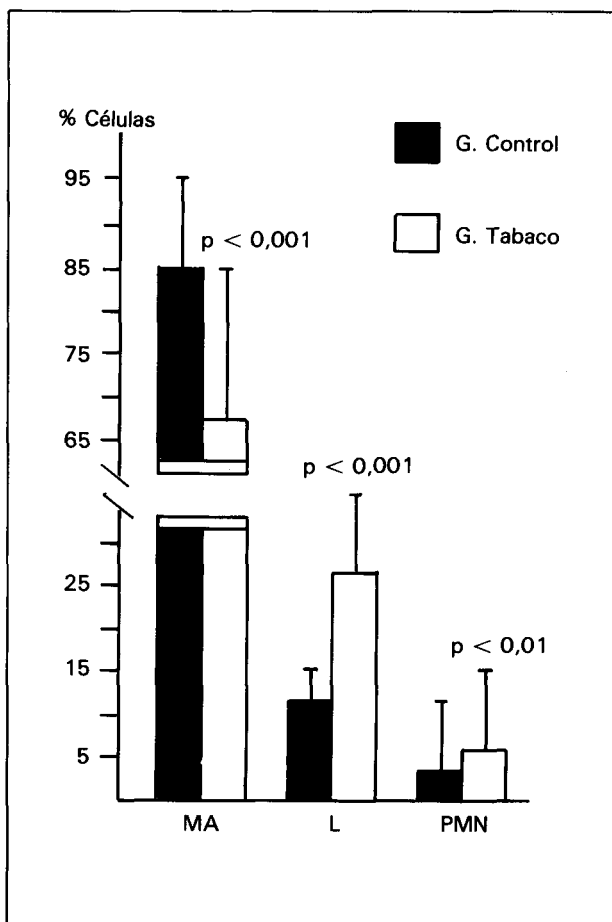


Fig. 7. Resultado porcentual del lavado broncoalveolar (media + desviación típica) y significación estadística entre los dos grupos. MA = macrófagos alveolares, L = linfocitos, PMN = polimorfonucleares.

Resultados

Desde el comienzo de la manipulación hasta el momento del sacrificio, los animales expuestos a humo de tabaco presentaron una pérdida media de peso de 22 g, que fue significativa (p < 0,001).

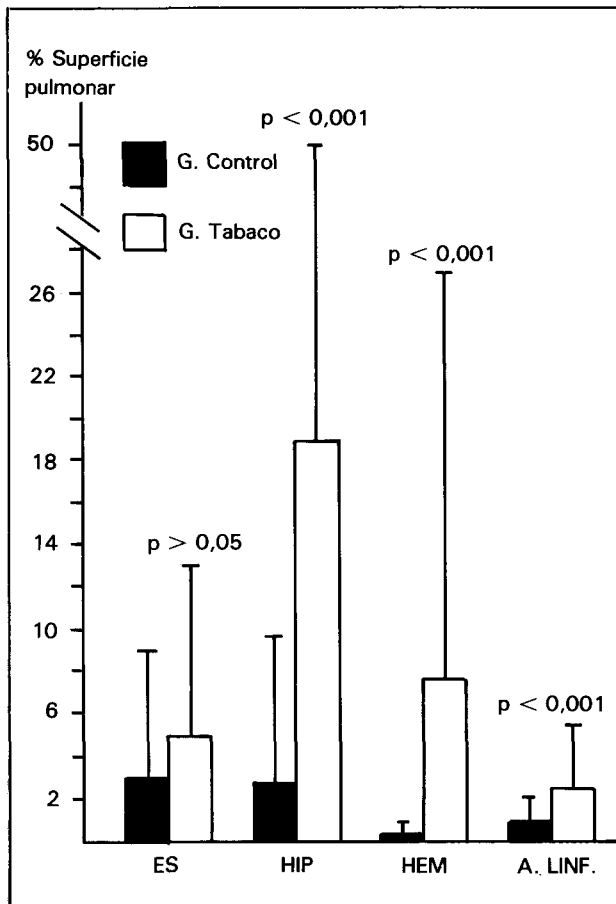
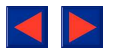


Fig. 8. Superficie pulmonar afectada por las diferentes alteraciones estudiadas (media + desviación típica) y su significación estadística. ES = Engrosamiento septal, HIP = Hiperinsuflación pulmonar, HEM = hemosiderina, ALINF = área linfática de los TLAB.

Estudio citológico (fig. 7): Estos dos grupos mostraron diferencias significativas en el conteo porcentual de las células de LBA ($p < 0,001$), ya que en los animales expuestos a humo de tabaco había aumentado de linfocitos ($\bar{x} = 27,1 \pm 18,3\%$) y PMN ($\bar{x} = 5,6 \pm 9,7\%$), junto a disminución de MA ($\bar{x} = 67,8 \pm 17,1\%$).

Estudio morfométrico (figs. 8-10): todas las variables histológicas estaban aumentadas en los animales expuestos a humo de tabaco, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) excepto el engrosamiento septal (fig. 8), que si bien estaba aumentado, su diferencia con el grupo control no fue significativa. Sobre estas variables objetivas es conveniente precisar algunas observaciones como en el caso de la hiperinsuflación pulmonar, que con la técnica de la orceína no se demostró una falta de elastina en ninguno de los dos grupos (fig. 1). En el caso del engrosamiento septal, en nuestra consideración, la elastina estaba disminuida (fig. 2).

Estudio isotópico (fig. 11): La media de captación de Ga^{67} en los pulmones del segundo grupo ($\bar{x} = 0,128 \pm 0,04\%$), y su cociente de captación Pulmón/Hígado ($\bar{x} = 144 \pm 4,4$) fue inferior al grupo control ($\bar{x} = 0,139 \pm 0,01\%$ y $\bar{x} = 21,5 \pm 3,5$ respectivamente), presentando sólo diferencias significativas el cociente P/H ($p < 0,001$).

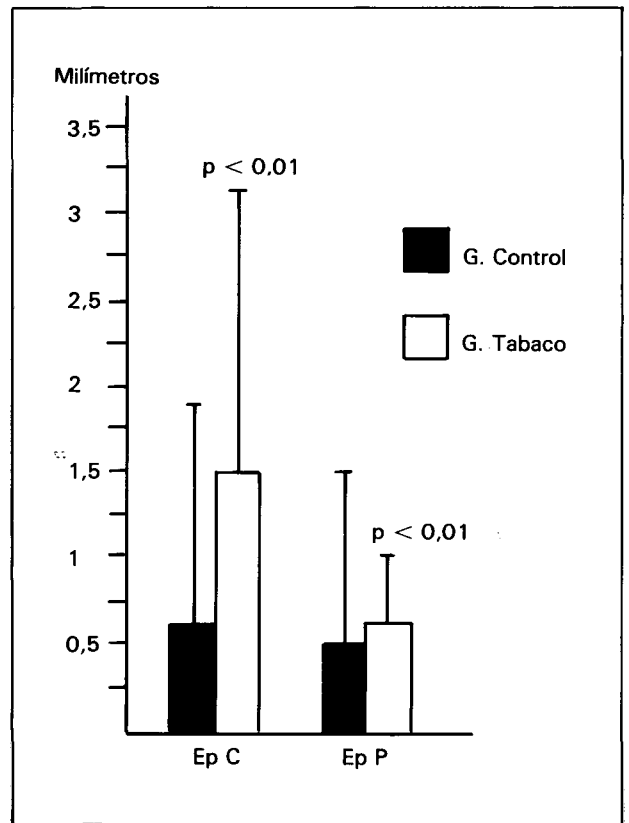


Fig. 9. Longitudes en milímetros (media + desviación típica) y significación estadística de los epitelios en contacto (Ep C) y epitelios planos (Ep P) del TLAB.

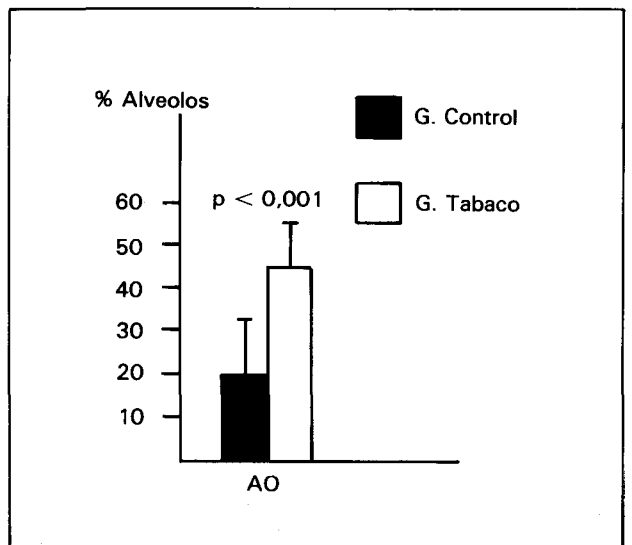


Fig. 10. Porcentaje (media + desviación típica) de alveolos ocupados (AO) respecto al total de los mismos, con su significación estadística.

Discusión

El LBA puede servir de introducción en la discusión de los resultados, ya que si al aumento de linfocitos se le considera como expresión de una patología alveolointersticial^{16,17}, en este caso hay que sumar una proliferación de PMN. Está descrito el aumento de PMN en los individuos fumadores,

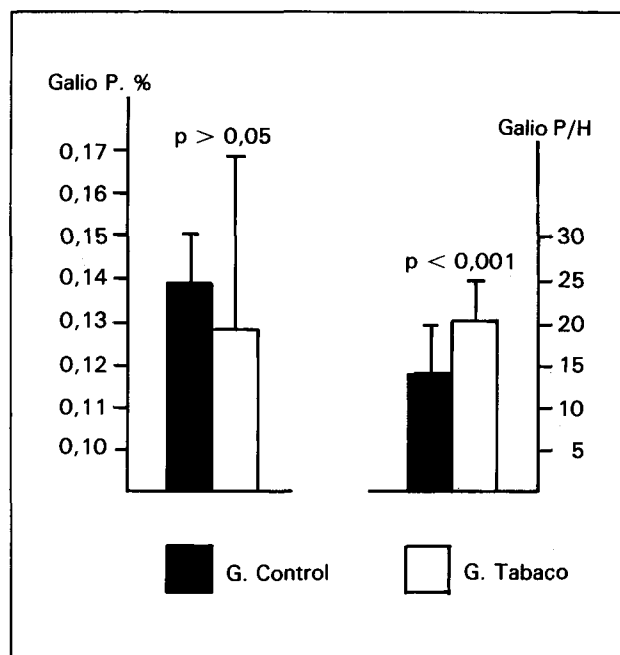


Fig. 11. Porcentaje de captación de Ga⁶⁷ respecto al administrado (media + desviación típica) y grado de significación. Galio P = captación del pulmón, Galio P/H = cociente de captación.

aunque no en cifras muy altas¹⁸. En este experimento, el gran aumento de PMN encontrado podría relacionarse con una fibrosis pulmonar^{19,20} o bien con una alveolitis aguda²¹. El humo de tabaco estimula la proliferación de MA²², y éstos a su vez segregan dos potentes factores quimiotácticos de los PMN^{23,24}. En contra de esto no se puede aducir la disminución porcentual de MA en el LBA, ya que se ha demostrado experimentalmente en procesos inflamatorios un incremento porcentual y absoluto de PMN, mientras que los MA sólo aumentan en valores absolutos²¹. También la interleukina-1 puede aumentar la adherencia de los PMN al endotelio capilar^{25,26}. En la migración de PMN al pulmón, intervienen otros factores; la nicotina y otros productos derivados del humo de tabaco activan al complemento²⁷⁻²⁹, y en particular al C₅, siendo éste un potente factor quimiotáctico de los PMN^{28,30,31}.

Aunque el enfisema ha sido repetidamente relacionado con el humo de tabaco^{32,34}, no puede considerarse como tal el aumento de las cavidades aéreas en los animales expuestos a humo de tabaco, ya que con la tinción de orceína no se ha apreciado pérdida de fibras elásticas. Huber et al³⁵, tras exponer a humo de tabaco durante seis meses a 300 ratas, no pudieron demostrar que existiera un auténtico enfisema. Estos autores concluyeron que «se había producido una reducción relativa de parénquima pulmonar, y que estos cambios estructurales se caracterizaban por una pérdida de las propiedades elásticas». Estos cambios morfológicos similares al enfisema pueden relacionarse con la pérdida de peso encontrada en nuestros animales y en los del trabajo de Huber et al³⁵, ya que se han producido modelos experimentales en pulmones de ratas desnutridas que morfológica, morfométrica y funcionalmente podrían ser considerados como enfisematosos³⁶. Morfométricamente, basándose en los principios de Weibel³⁷ se ha demostrado que tras la administración conjunta de humo de tabaco y elastasas se puede llegar a un modelo experimental de enfisema en la rata³.

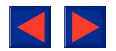
Las variables engrosamiento septal y alveolos ocupados, pueden erróneamente en un principio considerarse la misma, sin embargo en la primera, junto al aumento del tabique alveolar, hay una desestructuración pulmonar a la par que la elastina se encuentra, a nuestro parecer disminuida; esto se puede relacionar con un proceso inflamatorio de destrucción y reposición del tejido pulmonar, ya que la carencia de elastina se asocia con un número de PMN^{38,39}. Los alveolos ocupados por el contrario, se caracterizan por conservar la estructura pulmonar, junto a una falta de afinidad por el colorante en estas zonas, pudiendo ser esto un signo de edema intersticial debido al aumento de la permeabilidad alveolocapilar que produce el humo de tabaco^{6,7,40}.

Mishkin⁴¹ sistematiza el aumento de la permeabilidad alveolocapilar en tres grados; en el primero sólo se permite el paso a sustancias de bajo peso molecular (agua, sales y pequeñas proteínas), en el segundo pasan moléculas de mayor tamaño, y en el tercero, células. Estos tres grados se corresponden con sendas alteraciones morfológicas, de los que en el primero no se demuestra lesión. En los animales expuestos a humo de tabaco, en una parte significativa de sus pulmones ha habido una gran alteración de la permeabilidad puesto que ha pasado hemoglobina, aunque se ha de considerar que ésta sólo comprometió a una media de $7,6 \pm 19,1$ % del total de la superficie pulmonar estudiada, y nosotros consideramos que los alveolos ocupados son expresión de una afectación de mayor superficie pero de menor intensidad, no interfiriendo esto en el funcionamiento normal del pulmón.

Las variables bronquiales estudiadas constituyen lo que se conoce como «tejido linfático asociado al bronquio» (TLAB), que es una pieza clave en la respuesta inmunológica del pulmón ya que prolifera tras la exposición a antígenos⁴² y consta de una parte linfática con células T y B y otra epitelial. En los roedores participa muy activamente en el aclaramiento alveolar ya que moviliza sustancias y células desde el intersticio a la luz bronquial, atravesando el epitelio del TLAB⁴³.

Los únicos autores de los consultados que plantean el TLAB en los animales expuestos a humo de tabaco, encontraron disminuida la parte linfática³⁵, al contrario que en nuestro experimento, aunque coincidimos con ellos en el aumento del epitelio plano (Ep P), que lo consideraron como metaplasia. Sin embargo, está descrito como parte integrante del TLAB y es por donde son expulsadas las células hacia la luz bronquial; por lo que sería lógico que aumentara tras la exposición a humo de tabaco. Al igual que los colorantes utilizados para marcar experimentalmente el tránsito del aclaramiento alveolar⁴³, el carbón y otras partículas del tabaco podrían utilizar esta misma vía de aclaramiento. La disminución de la parte linfática encontrada por éstos, puede ser interpretado en el sentido de un agotamiento de la respuesta ya que nosotros hemos encontrado imágenes similares tras exponer largo tiempo a los animales a seroalbúmina bovina⁴⁴.

Lo acontecido con el Ga⁶⁷ sorprende ante las referencias descritas hace 8 años por distintos grupos de trabajo⁴⁵⁻⁴⁷ que relacionaban íntimamente el aumento de la captación del Ga⁶⁷ con las alteraciones alveolointersticiales en las que hay un aumento del metabolismo celular. Otros autores, intentando precisar más, han relacionado el Ga⁶⁷ con las células monocíticas, linfocitos T, etc⁴⁸⁻⁵¹. En este experimento sin embargo, no se han podido relacionar las alteraciones pulmonares encontradas con un aumento de la captación de este isótopo, por lo que habría que valorarlo cuando en enfermos con patología alveolointersticial no se obtengan los resultados esperados en esta prueba.



No se midió la proporción de alquitranes y nicotina del cigarrillo, ni carboxihemoglobina en los animales como otros autores, ya que estas variables no aportaron datos útiles en las conclusiones finales de sus experimentos.

Concluyendo, en este estudio de exposición pasiva a humo de tabaco, se ha obtenido un patrón morfológico similar al de los que hemos llamado fumadores activos involuntarios. Nos hubiera gustado compararlo con otros modelos de fumador pasivo que hubieran seguido diferentes pautas, pero insistimos que no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica. Nuestros resultados se han obtenido tras seguir un protocolo de exposición más intenso y breve que el de Huber et al³⁵, que administraron humo de tabaco a 300 ratas con una máquina automática durante 3 meses y sólo encontraron en el pulmón alteraciones inespecíficas.

Agradecimiento

Este trabajo se ha realizado gracias a una ayuda de investigación de la Diputación General de Aragón número CM-14/85.

BIBLIOGRAFIA

1. Sneider GL, Lucey EL, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:149-169.
2. Matulonis DH, Trauring HH. In situ response of lung macrophages and hydrolase activities to cigarette smoke. *Lab Invest* 1977; 37:314-326.
3. Kimmel EC, Winsett DW, Diamond L. Augmentation of elastase-induced emphysema by cigarette smoke. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:885-893.
4. Harris JO, González-Rothi RJ. Abnormal phagolysosome fusion in pulmonary alveolar macrophages of rats exposed chronically to cigarette smoke. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:467-471.
5. Heckman CA, Lehman GL. Ultrastructure and distribution of intracellular spicules in rat lung following chronic tobacco smoke exposure. *J N C I* 1985; 74:647-657.
6. Minty BD, Royston D. Cigarette smoke induced changes in rat pulmonary clearance of 99mTcDTPA. A comparison of particulate and gas phases. *Am Rev Respir Dis* 1985; 1170-1173.
7. Hulbert WC, Walker DC, Jackson A, Hogg JC. Airway permeability to hoseradish peroxidase in guinea pigs: the repair phase after injury by cigarette smoke. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:320-326.
8. Osman M, Cantor JO, Roffman S, Keller S, Turino GM, Mandl I. Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:640-643.
9. Weiss ST, Tager IB, Schenker M, Speizer FE. The health effects of involuntary smoking. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:933-942.
10. Weiss ST. Passive smoking and lung cancer. What is the risk? *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1-3.
11. Burns TR, Greenberg SD, Cartwright J, Jachimczyk JA. Smoke inhalation: an ultrastructural study of reaction to injury in the human alveolar wall. *Environ Res* 1986; 41:447-457.
12. Demling RH. Smoke inhalation injury. *Postgraduate Medicine* 1987; 82:63-68.
13. Urch RB, Silverman F, Shephard RJ, Corey O. Acute physiological responses to passive cigarette smoke in asthmatic individuals. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A153.
14. O'Connor GT, Weiss ST, Tager IB, Speizer FE. The effect of passive smoking on pulmonary function and nonspecific bronchial responsiveness in a population-based sample of children and young adults. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:800-804.
15. Colton T. Estadística en medicina. Barcelona, Salvat ed, S.A. 1979; 233.
16. Ettenson DB, Lalor PA, Roberts NJ. Human alveolar macrophage regulation of lymphocyte proliferation. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1091-1096.
17. Lyons CR, Ball EJ, Toews GB, Weissler JC, Stastny P, Lipscomb MF. Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T-cell macrophage binding. *J Immunol* 1986; 137:1173-1180.
18. Daniele R, Elias J, Epstein P, Rossman M. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 1985; 102:93-108.
19. Crystal RG, Fulmer JD, Roberts WC, Moss ML, Line BR, Reynolds HY. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann Intern Med* 1976; 85:769-788.
20. Hunninghake GW, Gadek JE, Weimberger SE, Kelman JA, Elson NA, Young RC, Fulmer JD, Crystal RG. Comparison of the alveolitis of sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1979; 75:(suppl)266-267.
21. Brieland JK, Kunkel RG, Fantone JC. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:1300-1306.
22. Green GH, Jakab GJ, Low RB, Davis GS. Defense mechanism of the respiratory membrane. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115:479-514.
23. Merrill WW, Naegell GP, Mattmay RA, Reynolds HY. Alveolar macrophage derived chemotactic factor. Kinetics of in vitro production and partial characterization. *J Clin Invest* 1980; 65:268-276.
24. Hunninghake GW, Gadek J, Crystal RG. Human alveolar macrophage neutrophil chemotactic factor: stimuli and partial characterization. *J Clin Invest* 1980; 66:473-483.
25. Bocher BS, Landy SD, Plant M, Dinarello CA, Scheimer RP. Interleukin 1 production by human lung tissue. I. Identification and characterization. *J Immunol* 1987; 139:2297-2302.
26. Bocher BS, Rutledge BK, Scheimer RP. Interleukin 1 production by human lung tissue. II. Inhibition by anti-inflammatory steroids. *J Immunol* 1987; 139:2303-2307.
27. Kew RR, Ghebrehwet B, Janoff A. The role of complement in cigarette smoke-induced chemotactic activity of lung fluids. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:478-481.
28. Kew RR, Ghebrehwet B, Janoff A. The fifth component of complement (C5) is necessary for maximal pulmonary leukocytosis in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43:73-81.
29. Kew RR, Ghebrehwet B, Janoff A. Characterization of the third component of complement (C3) after activation by cigarette smoke. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 44:248-258.
30. Bender JG, Van Epps DE, Chenoeth DE. Independent regulation of human neutrophil chemotactic receptors after activation. *J Immunol* 1987; 139:3028-3033.
31. Harvath L, McCall CE, Bass DA, McPhail LC. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by the protein kinase inhibitor 1(5-isoquinolinesulfonyl) piperazine. *J Immunol* 1987; 139:3055-3061.
32. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L, Benante C. Relation of smoking and age to emphysema: whole lung section study. *N Engl J Med* 1972; 286:853-857.
33. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiproteases deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979; 206:1315-1316.
34. Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang N-S, King M, Ghezzi H, Cosio MG. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:764-769.
35. Huber GL, Davies P, Zwilling GR, Pochay VE, Hinds WC, Nicholas HA, Mahajan VK, Hayashi M, Fist MW. A morphologic and physiologic bioassay for quantifying alterations in the lung following experimental chronic inhalation to tobacco smoke. *Bull Europ Physiopath Resp* 1981; 17:269-327.
36. Sahebajami H, Wirman JA. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124:619-624.
37. Weibel ER, Gómez D. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 1962; 17:343-348.
38. Olsson K, Olsson I. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *Eur J Biochem* 1974; 42:519-527.
39. Baugh RJ, Travis J. Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. *Biochemistry* 1986; 15:836-841.



40. Witten ML, Lemen RJ, Quan SF, Sobonya RE, Roseberry H, Stevenson JL, Clayton J. Acute cigarette smoke exposure increases alveolar permeability in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:321-325.
41. Mishkin FS, Niden A, Kumar A, Thomas A, Reese IC, Vasinrapee P. Albumin lung-heart ratio change. A single clinical means of documenting increased pulmonary endothelial permeability to protein. *JAMA* 1987; 257:953-956.
42. Racz P, Tenner-Racz K, Myrvin QN, Fainler LK. Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *J Reticuloendothel* 1977; 22:59-83.
43. Bundelet PJ. Experimental study of the dust clearance mechanisms of the lung. *Acta Pathol Microbiol Scan* 1965; 175:1-139.
44. Ariño Martín MD. Inferencia del humo de tabaco en las neumonitis por hipersensibilidad a seroalbúmina bovina. Estudio morfológico en la rata. Tesis Doctoral 1988. Zaragoza.
45. Bekerman C, Hoffer PB, Bitran JD, Gupta RG. Gallium-67-citrate imagen studies of the lung. *Sem Nuclear Med* 1980; 10:286-300.
46. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staining and therapy. *Am J Med* 1981; 70:542-568.
47. Kim EE. Diffuse pulmonary gallium concentration. *Sem Nuclear Med* 1980; 10:108-301.
48. Spies WG, Spies SM, Mintzer RA. Radionucleide imagen in diseases of the chest. *Chest* 1983; 83:250-255.
49. Begin R, Cantin A, Drapeau G, Lamoureux G, Boctor H, Massé S, Rola-Pleszczynski M. Pulmonary uptake of gallium-67 in asbestos exposed humans and sheep. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:623-630.
50. Line BR, Hunninghake GW, Keogh BA, Jones AE, Johnston GS, Crystal RG. Gallium-67 scanning to stage the alveolitis of sarcoidosis: correlation with clinical studies, pulmonary function studies and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:440-446.
51. Stanislas-Leguerin G, Massé R, Chretien J, Huchon G. Mononuclear cells are responsible for pulmonary gallium uptake in rats with granulomatosis induced by complete freund adjuvant. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133A8.