

Acção do Fumo de Tabaco nas Respostas Inflamatória e Imunitária

(Avaliação «in vivo» e «in vitro»)

M. A. SANTOS ROSA, A. MOTA PINTO, M. F. GARÇÃO, M. A. LIMA, A. C. P. LEITE e A. J.A. ROBALO CORDEIRO

CENTRO DE IMUNOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE COIMBRA
CENTRO DE PNEUMOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (CNC3-INIC)
(Director: Prof. Dr. ROBALO CORDEIRO).

RESUMO

O fumo de tabaco tem sido implicado na produção de diversas alterações das respostas inflamatória e imunitária, não só a nível do compartimento broncoalveolar, mas também no sangue periférico, embora ainda se encontrem por esclarecer algumas destas alterações. Em relação à resposta inflamatória, a acção do fumo de tabaco sobre o Inibidor Alfa-1 das Proteases (IA1P) é da maior importância, mas apesar de ser conhecido que o fumo de tabaco bloqueia, intensamente, a acção funcional desta proteína no pulmão profundo, não é claro que tal se passe em situação «fisiológica», ou que este bloqueio funcional atinja o compartimento sistémico.

Estudos «in vivo»

Num grupo de 929 indivíduos sem queixas clínicas, recrutados de forma aleatória a partir do Norte, do Centro e do Sul de Portugal, estudamos, no soro, a resposta imunitária humoral (imunoglobulinas G, A, M e E), a resposta inflamatória aguda proteica (IA1P, Alfa-2-Macroglobulina — A2M —, Haptoglobina — HPT — e a Proteína C-Reactiva — PCR —) e a Capacidade Inibidora Tripsina (CIT); a CIT/gIA1P foi obtida, matematicamente, através da fórmula: $CIT/gIA1P = CIT/IA1P \times 100$.

O sexo masculino representava 61% deste grupo, com uma idade média de 40 ± 13 anos; 36% eram Fumadores (F), com uma carga tabágica de $23,8 \pm 20,8$ maços-ano. O sexo feminino atingia 39%, com uma idade média de 39 ± 17 anos; 7% eram fumadores, com uma carga tabágica de $5,3 \pm 4,5$ maços-ano.

Os resultados analíticos mostraram uma diminuição da concentração sérica da IgG e da IgM e um aumento da IgE no subgrupo dos fumadores. Algumas proteínas da resposta inflamatória (IA1P e HPT) estavam, também, aumentadas neste subgrupo. A CIT não mostrou variações assinaláveis, enquanto que a CIT/gIA1P estava diminuída nos fumadores com uma carga tabágica de 10 a 19 maços-ano, quando comparada com a de Não Fumadores (NF), equiparados, individualmente, por idade e sexo.

Estudos «in vitro»

Acção do fumo de tabaco no líquido de lavagem broncoalveolar:

O fumo de cigarro foi borbuhlado, directamente, ou depois de diluição com o ar atmosférico, em Líquidos de Lavagem Broncoalveolar (LLBAs) obtidos de 17 jovens saudáveis, voluntários para a lavagem broncoalveolar (fumadores e não fumadores). Os resultados apontaram para uma diminuição intensa da CIT e da Capacidade Inibidora da Elastase (CIE) depois da acção do fumo de cigarro, especialmente quando o fumo era borbuhlado, directamente, no LLBA.

Acção do fumo de tabaco no crescimento celular:

Na tentativa de se obter um processo automatizado para o estudo, «in vitro», da acção do fumo de tabaco no crescimento e diferenciação celulares, desenvolvemos um protocolo analítico especial, adaptado ao «Mutascreeen». Neste protocolo, quantidades crescentes de solução salina de fumo de cigarro eram misturadas e incubadas com *Salmonella typhimurium* TA100. Durante 24 horas, de 10 em 10 minutos, foram recolhidos os dados espectrofotométricos destas culturas. Os resultados obtidos com as soluções salinas de fumo de tabaco mostraram um atraso no Início do Crescimento Celular (ICC), um aumento do Tempo Médio de Geração Celular (TMGC) e uma intensa diminuição da Taxa Média de Sobrevivência Celular (TMSC).

Estes estudos sugerem uma acção inibidora do fumo de tabaco sobre a resposta imunitária humoral, a estimulação das proteínas da resposta inflamatória e uma pronunciada acção depressora («in vitro») da capacidade antiproteásica do IA1P e do crescimento celular da *Salmonella*. Esta última acção, a manter-se semelhante em relação a células humanas, é particularmente importante no sentido de uma melhor compreensão e discussão das reacções orgânicas celulares, despertadas pelo fumo de tabaco.

I — INTRODUÇÃO

A influência do hábito tabágico sobre os componentes proteicos das respostas imunitária e inflamatória tem sido, repetidamente, abordada [2,3, 5,6,7,8], continuando, apesar disso, por clarificar muitos dos aspectos da reacção individual (quer pulmonar, quer sistémica) ao fumo de tabaco.

Um deles liga-se directamente com a capacidade funcional antiproteásica que, a nível local (alvéolos pulmonares), tem sido demonstrada como diminuída por acção do fumo de tabaco [1,2], através de uma oxidação do inibidor alfa-1 das proteases, ou do recrutamento de células (como os macrófagos) capazes de produzir proteases destruidoras deste inibidor; contudo, até que ponto esta acção se expande ao compartimento sistémico não se encontra, ainda, completamente esclarecido, havendo mesmo observações contraditórias, umas, afirmando a diminuição da actividade antiprotease no sangue, por acção do fumo de tabaco [5], outras, não encontrando qualquer alteração significativa [3,4,9].

Desta forma, tivemos como objectivo principal estudar as respostas inflamatória e imunitária periféricas (através dos seus componentes proteicos) num vasto grupo de indivíduos clinicamente normais (fumadores e não fumadores), bem como o de realizar alguns protocolos experimentais que pudessem ajudar a esclarecer as influências do fumo de tabaco sobre a actividade funcional, no pulmão, do inibidor alfa-1 das proteases.

Finalmente, atendendo a que a acção do fumo de tabaco não parece confinar-se apenas aos componentes humorais das respostas orgânicas, mas, também, aos celulares [6,8], iniciamos um protocolo experimental para o estudo automatizado da influência do fumo de tabaco no desenvolvimento celular.

II — MATERIAL E MÉTODOS

1 — Material

Este trabalho baseou-se (no que diz respeito à avaliação «in vivo») em estudos realizados em dois grupos populacionais: o primeiro (Grupo I), constituído por 929 indivíduos seleccionados de forma aleatória, oriundos do Norte, Centro e Sul de Portugal, sem manifestações clínicas anormais e voluntários para a colheita de sangue venoso, e o segundo (Grupo II), formado por 17 indivíduos, também clinicamente normais, voluntários para a colheita de sangue venoso e para a lavagem broncoalveolar.

Para os estudos «in vitro» utilizaram-se culturas de *Salmonella typhimurium* TA100, Líquidos de Lavagem Broncoalveolar (LLBAs) e extractos salinos de fumo de tabaco. Estes extractos foram obtidos de acordo com o esquema da Fig. 1, fazendo passar o fumo de tabaco (3 cigarros aspirados suavemente, com intervalos de 30 segundos entre as aspirações, que duravam 5 s) por 100 ml de soro fisiológico. Entre cada cigarro procedeu-se à agitação do balão de «Kitasato», no sentido de favorecer a dissolução do fumo, ainda presente dentro do balão. Julga-se que este método permitiu uma boa dissolução do fumo de tabaco, sem grande alteração do seu conteúdo natural, particularmente por se terem evitado as altas temperaturas de combustão do cigarro, uma vez que as aspirações eram, apenas, de 5 s, com intervalos de 30 s.

2 — Métodos

Para a determinação das Imunoglobulinas G, A e M (IgG, IgA, e IgM), do Inibidor Alfa-1 das Proteases

(IA1P), da Alfa-2 Macroglobulina (A2M), da Haptoglobina (HPT) e da Proteína C-Reactiva (PCR) utilizou-se a Nefelometria Laser Computarizada, com calibradores e controlos referenciados pelo «CAP». A Imunoglobulina E (IgE) foi determinada por método imunoenzimático. A Capacidade Inibidora da Tripsina (CIT) e da Elastase (CIE) foram avaliadas por Espectrofotometria Cinética Computarizada, utilizando substratos sintéticos apropriados para as enzimas em causa. A Capacidade Inibidora da Tripsina por grama de IA1P (CIT/gIA1P) foi determinada, matematicamente, através da fórmula $CIT/IA1P \times 100$, representando a actividade molecular antitripsina do IA1P.

Para o estudo da acção do fumo de tabaco sobre o crescimento celular da *Salmonella typhimurium* TA100 foi utilizado um sistema de espectrofotometria vertical computarizada («Mutascree»), de acordo com o protocolo esquematizado na Fig. 2 e, por nós, especialmente, desenvolvido para este efeito. As quantidades de Soro Fisiológico + Fumo de Tabaco (SF + FT) foram determinadas experimentalmente até se obter um ajuste ideal para o funcionamento do equipamento; desta forma, verificou-se que 20 μ l eram suficientes para a sensibilidade analítica pretendida, sem chegarem a ser letais para as células em cultura. O controlo do crescimento celular da *Salmonella typhimurium* TA100 foi feito com 20 μ l de meio de cultura, mais 20 μ l de soro fisiológico. Os resultados obtidos pelas leituras da Absorvância (ABS), cadenciadas de 10 em 10 mn, durante as 24 h de incubação, a 37°C, foram tratados em computador, de forma a obterem-se as curvas de crescimento celular, a Taxa Média de Sobrevivência Celular (TMSC), o Tempo Médio de Geração Celular (TMGC) e o Início do Crescimento Celular (ICC).

III — RESULTADOS

1 — Características gerais dos grupos estudados

O Grupo I era constituído por 563 indivíduos do sexo masculino (60,6%) e por 366 do feminino (39,4%). Os homens tinham uma idade média de 40 anos, com um desvio padrão de 13 anos (40 ± 13) e uma média de consumo de tabaco de $23,8 \pm 20,8$ maços-ano. As mulheres tinham uma idade média de 39 ± 17 anos e uma média de consumo de tabaco de $5,3 \pm 4,5$ maços-anos.

A distribuição por sexo, em relação à idade e ao hábito tabágico encontra-se representada nas Figs. 3 e 4; conforme se pode verificar, o Grupo I era formado por indivíduos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 10 e os 79 anos, dos quais

36% dos homens e, apenas, 7% das mulheres tinham hábito tabágico. Também a evolução da percentagem de fumadores com a idade era muito diferente nos dois sexos (Fig. 5), atingindo o máximo, para o masculino (58% de fumadores), no grupo etário mais alto (75-79 anos) e, para o feminino (25% de fumadores), no grupo etário dos 25-29 anos; aliás, verificava-se uma quase ausência de hábito tabágico nas mulheres com mais de 35-39 anos de idade.

Ainda, o consumo cumulativo de tabaco mostrava uma dispersão muito acentuada entre os 45 e os 60 anos, idades onde se verificou o aparecimento de novos fumadores (com hábito tabágico inferior a 5 maços-anos), a par de indivíduos com um consumo de tabaco superior a 80 maços-ano (Fig. 6). É de realçar que neste escalão etário (45 a 60 anos) não havia uma participação importante das mulheres na dispersão verificada no consumo de tabaco, pois, conforme já se referiu, ele era quase nulo neste sexo, a partir dos 35-39 anos.

O Grupo II era constituído por 17 jovens, com idades compreendidas entre 20 e 28 anos (média de 22 ± 2 anos), clinicamente normais, todos do sexo masculino, dos quais 11 (64,7%) eram fumadores. Contudo, o consumo cumulativo de tabaco era relativamente baixo ($6,3 \pm 4,6$ maços-anos).

2 — Resultados analíticos no soro (Grupo I)

Atendendo à baixa percentagem de fumadores do sexo feminino (apenas 7%, correspondendo a 27 casos) e à diferença significativa ($p < 0,001$) de idades entre fumadoras (29 ± 8 anos) e não fumadoras (40 ± 17 anos), entendeu-se justificável limitar o estudo das influências do hábito tabágico somente ao sexo masculino, representado por 363 não fumadores e 200 fumadores com médias de idade de, respectivamente, 40 ± 13 e 42 ± 12 anos.

Os estudos, no soro, da resposta imunitária humoral (IgG, A, M, E) e inflamatória proteica (IA1P, A2M, HPT e PCR) revelaram uma diminuição significativa da IgG e da IgM e um aumento, também significativo, da IgE, do IA1P e da HPT nos fumadores (Figs. 7 e 8).

A fim de melhor se esclarecer a acção do hábito tabágico sobre as respostas citadas (imunitária e inflamatória), procedeu-se à subdivisão do grupo dos fumadores em 3 subgrupos: o F1 (constituído por 54 fumadores com uma carga tabágica entre 1 e 9 maços-ano), o F10 (88 fumadores com 10 a 29 maços-ano) e o F30 (58 fumadores com uma carga tabágica superior, ou igual, a 30 maços-ano). A idade média de cada um destes subgrupos era de, respectivamente, 34 ± 11 , 40 ± 9 e 51 ± 10 anos; em comparação com a dos não fumadores (40 ± 13 anos), a idade do

subgrupo F1 era, significativamente, mais baixa ($p < 0,002$) e a do subgrupo F30, significativamente, mais alta ($p < 0,001$). Estas diferenças na idade média dos subgrupos, agora considerados, devem ter-se em conta como prováveis influências nos parâmetros analíticos estudados.

Nas Figs. 9 e 10 estão representadas as variações das proteínas estudadas, em cada subgrupo fumador, comparativamente com os não fumadores. Conforme se pode observar, verificou-se, em relação à resposta imunitária, uma diminuição significativa da IgG sérica nos três subgrupos de fumadores, mas, em relação à IgM, apenas nos fumadores com uma carga tabágica superior a 10 maços-ano. A IgA não mostrou alterações significativas, embora fosse apreciável uma ligeira diminuição de concentração com o aumento do consumo de tabaco; também a IgE não surgiu com alterações significativas, apesar de ter um ligeiro aumento nos fumadores.

No que diz respeito às proteínas da resposta inflamatória, não houve alterações significativas da A2M e da PCR, a par de um aumento do IA1P no subgrupo F30 e da HPT no F10 e F30; estes aumentos, significativos, da concentração, no soro, do IA1P e da HPT tiveram, contudo, um perfil diferente, sendo observável (ainda que de forma estatisticamente não significativa) um aumento da HPT em todos os subgrupos de fumadores, enquanto o IA1P não se alterou no subgrupo F1 (correspondente a pequenos fumadores).

O estudo da CIT e da CIT/gIA1P não conseguiu revelar alterações destes parâmetros nos fumadores, em relação aos não fumadores (CIT, nos não fumadores, igual a $2,17 \pm 0,54$ mmol/mn/l e, nos fumadores, igual a $2,22 \pm 0,53$ mmol/mn/l; CIT/gIA1P, nos não fumadores, igual a $1,41 \pm 0,34$ mmol/mn/gIA1P e, nos fumadores, igual a $1,37 \pm 0,29$ mmol/mn/gIA1P).

Apesar da ausência de significado estatístico, os fumadores tinham uma CIT mais elevada, contudo não tão intensamente quanto o nível sérico do IA1P, o que condicionava uma diminuição, ainda que não significativa, da actividade funcional antitripsina, por unidade de massa deste inibidor (CIT/gIA1P).

No intuito de esclarecer, na medida do possível, a influência (a nível periférico) do hábito tabágico no comportamento imunológico e funcional do IA1P, procedeu-se à divisão dos fumadores em 5⁽¹⁾ escalões de consumo de tabaco (1-9, 10-19, 20-29, 30-39 e ≥ 40 maços-ano). Nestas condições, a concentração

do IA1P aumentou significativamente a partir do escalão de 30-39 maços-ano (o que está de acordo com o já anteriormente verificado, quando da subdivisão em 3 escalões de hábito tabágico — F1, F10 e F30), não se detectando variações significativas da CIT e, apenas, uma diminuição da CIT/gIA1P no escalão de 10-19 maços-ano.

3 — Resultados analíticos a partir do LLBA (Grupo II)

O Grupo II, já anteriormente objecto de estudos analíticos específicos [9], apenas foi utilizado, no contexto deste trabalho, como fonte de LLBAs, considerados normais, que foram sujeitos a ensaios «in vitro» de inactivação do IA1P pelo fumo de tabaco.

Neste sentido, e de acordo com o esquema da Fig. 1, foi aspirado o fumo de um cigarro nas mesmas condições já descritas para a obtenção do extracto salino de fumo de tabaco, apenas com a substituição dos 100 ml de soro fisiológico por 20 ml de cada LLBA.

Também se realizaram experiências paralelas em que, entre o cigarro e o balão de aspiração, foi introduzido um tubo de plástico, enrolado em espiral, com um volume interno de, aproximadamente, 5 l; neste caso, iniciava-se a experiência com a aspiração do ar atmosférico, durante 1 mn, sem ligação do tubo ao balão (tempo suficiente para preencher o interior do tubo com ar fresco), seguida de aspiração do cigarro (já com o tubo ligado ao balão) que era prolongada até à completa remoção do fumo do interior do tubo.

Os resultados são apresentados nas Figs. 11 e 12, salientando-se as diminuições significativas da actividade funcional antitripsina e antielastase do IA1P (em especial desta última), tanto nos LLBAs de fumadores, como nos de não fumadores, embora nestes últimos se verificasse uma diminuição mais acentuada quer da CIT (69%, contra 60% nos fumadores), quer da CIE (73%, contra 63% nos fumadores).

O fumo de tabaco diluído no ar atmosférico (proveniente da experiência com o tubo adicional) teve sempre uma acção menos pronunciada na actividade funcional do IA1P, do que o fumo de tabaco directo, chegando mesmo a atingir diferenças significativas na CIE dos fumadores ($p < 0,01$) e dos não fumadores ($p < 0,02$).

(1) A escolha de 5 subgrupos baseou-se no facto de eles representarem o número máximo capaz de manter uma representação numérica estatisticamente aceitável em cada escalão ($n > 20$).

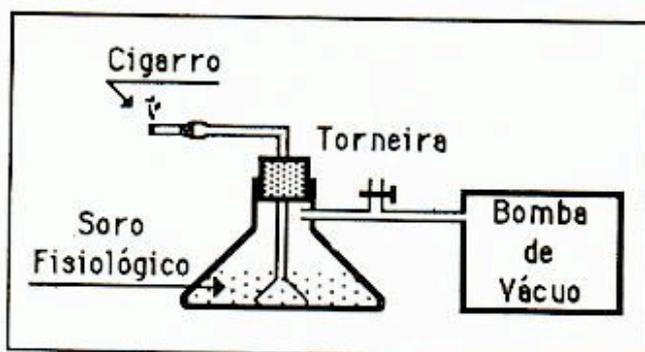


FIG. 1 — Esquema do modo de obtenção dos extractos salinos de fumo de tabaco.

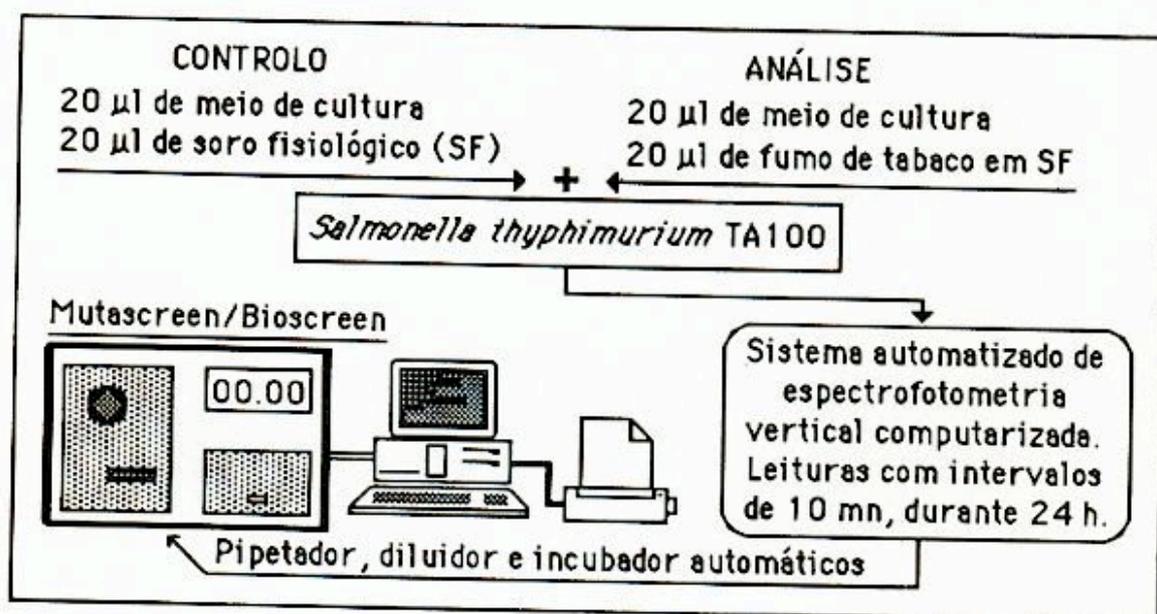


FIG. 2 — Protocolo analítico para o estudo da acção do fumo de tabaco sobre o crescimento celular.

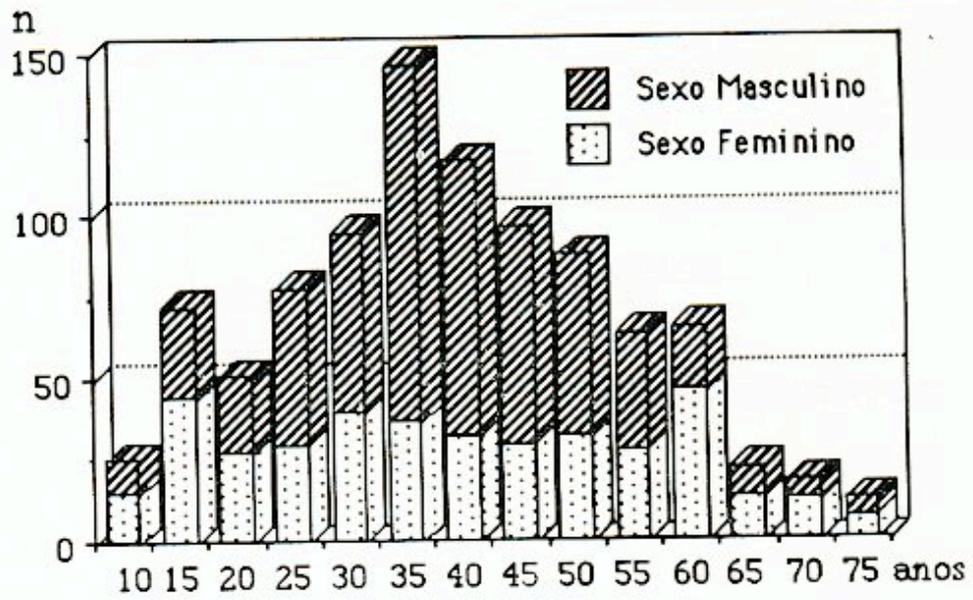


FIG. 3 — Distribuição da idade nos sexos masculino e feminino (Grupo I).

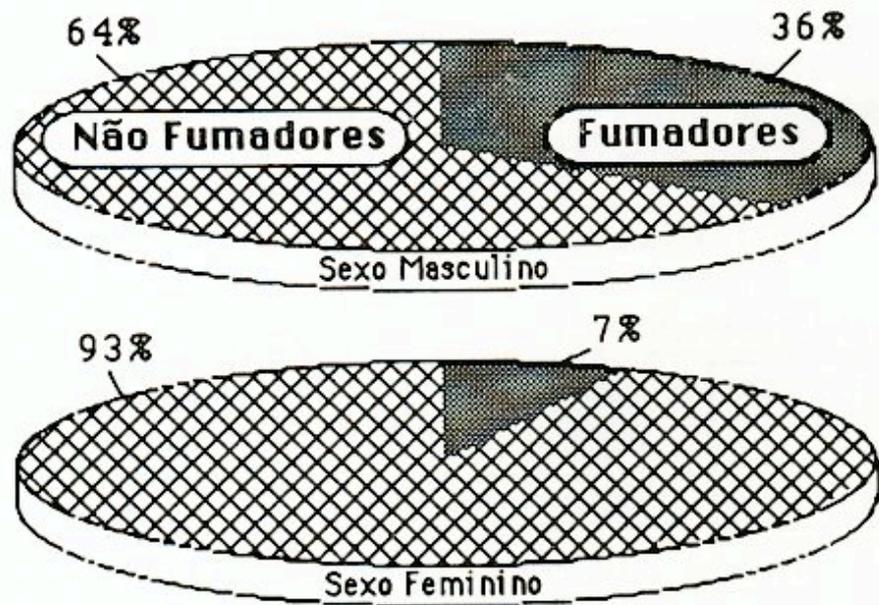


FIG. 4 — Distribuição de hábitos tabélicos nos sexos masculino e feminino (Grupo I).

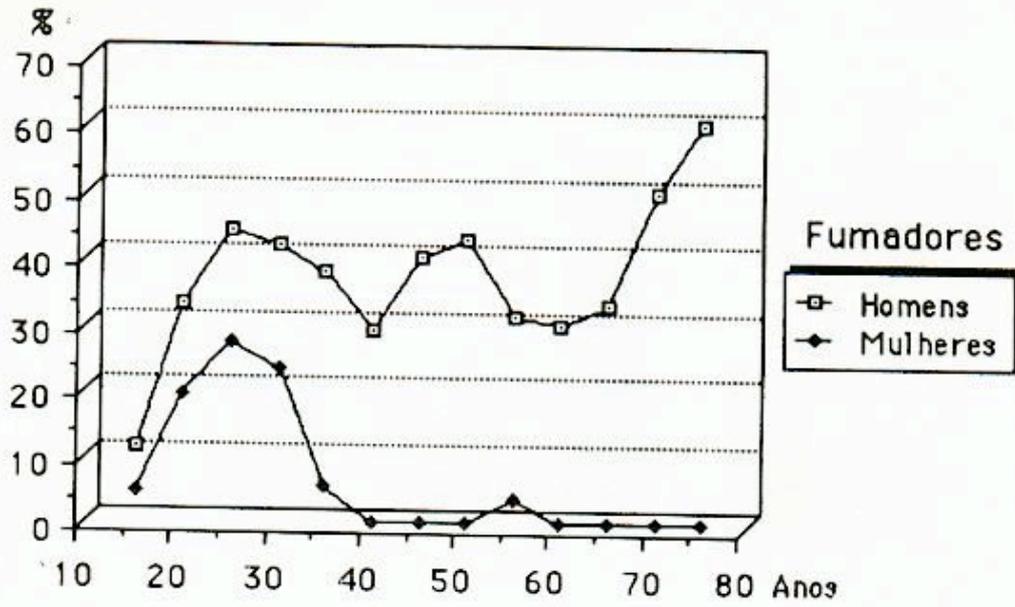


FIG. 5 — Evolução da percentagem de fumadores com a idade (Grupo I).

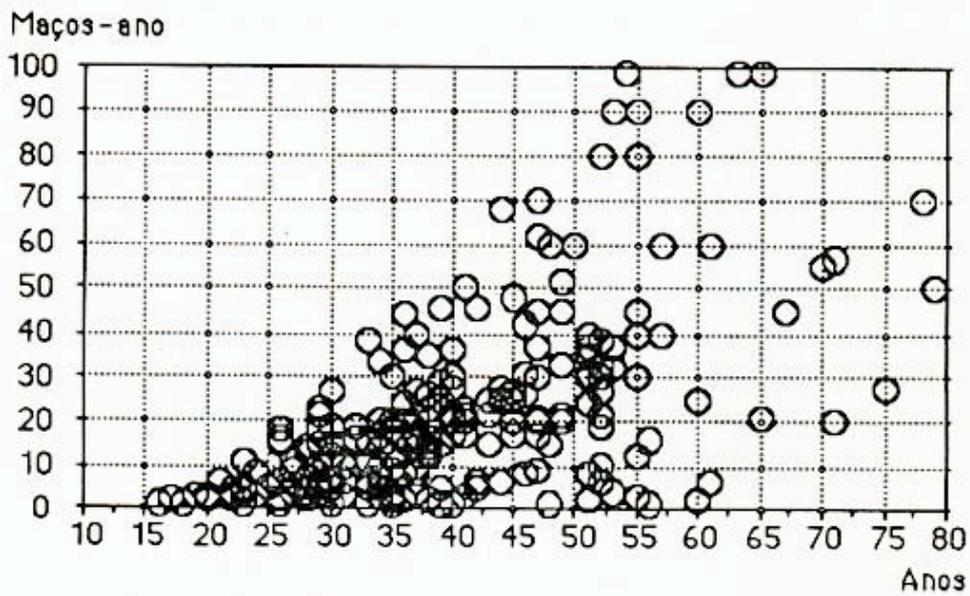


FIG. 6 — Distribuição da carga tabágica em relação à idade (Grupo I).

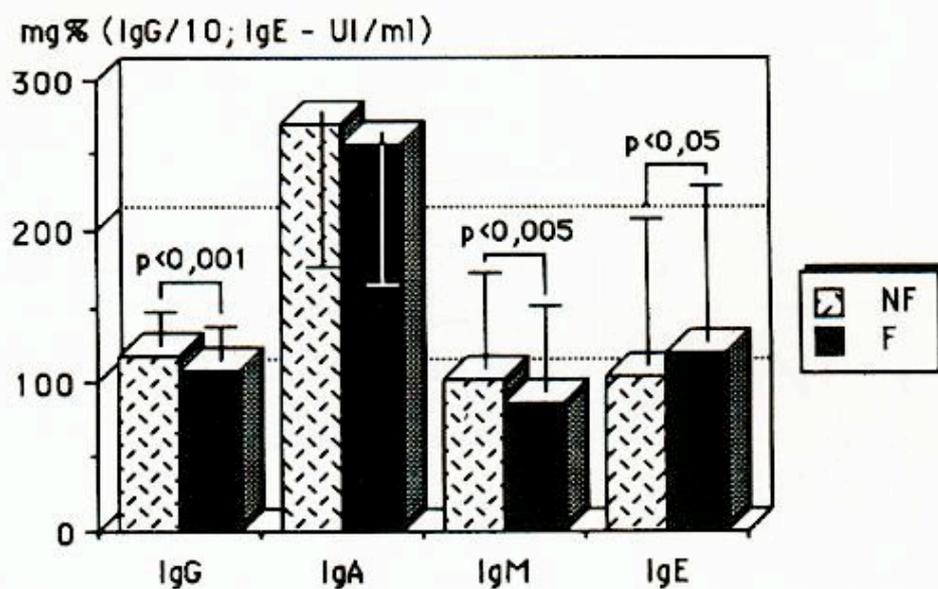


FIG. 7 — Estudo, no soro, da concentração de algumas proteínas da resposta imunitária humoral.
NF — Não fumadores; F — Fumadores.

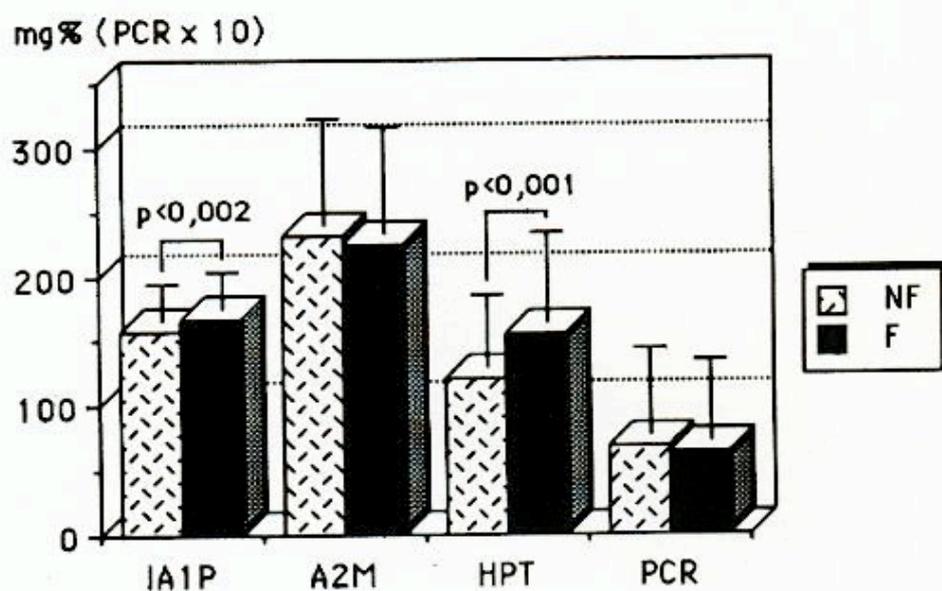


FIG. 8 — Estudo, no soro, da concentração de algumas proteínas da resposta inflamatória.
NF — Não fumadores; F — Fumadores.

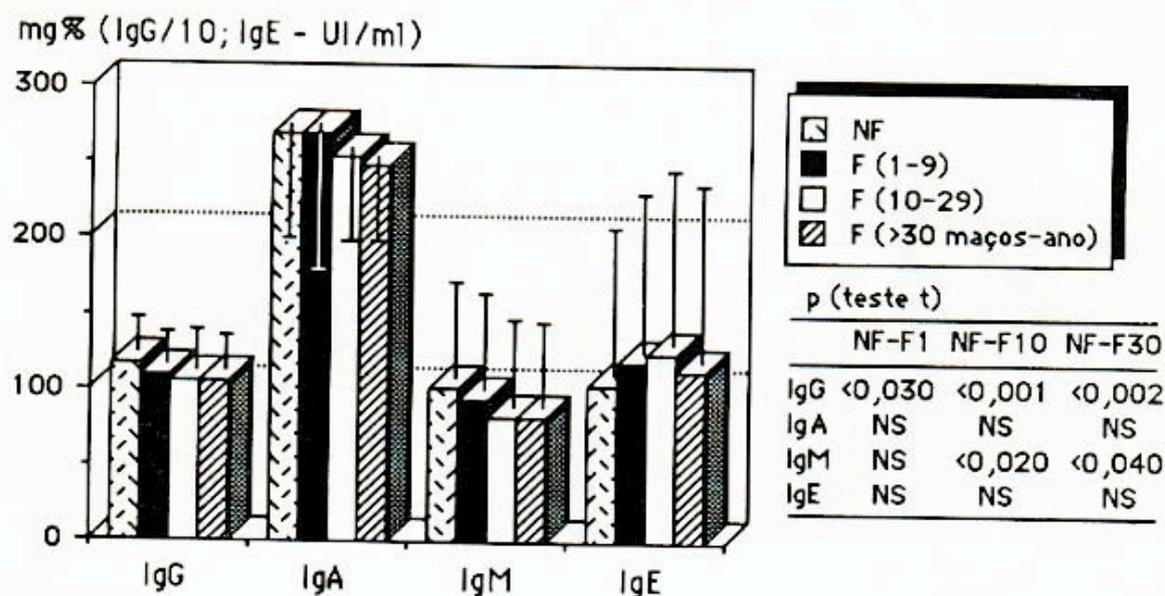


Fig. 9 — Estudo, no soro, da concentração de algumas proteínas da resposta imunitária humoral, discriminado por três escalões de carga tabágica (F1, F10 e F30).

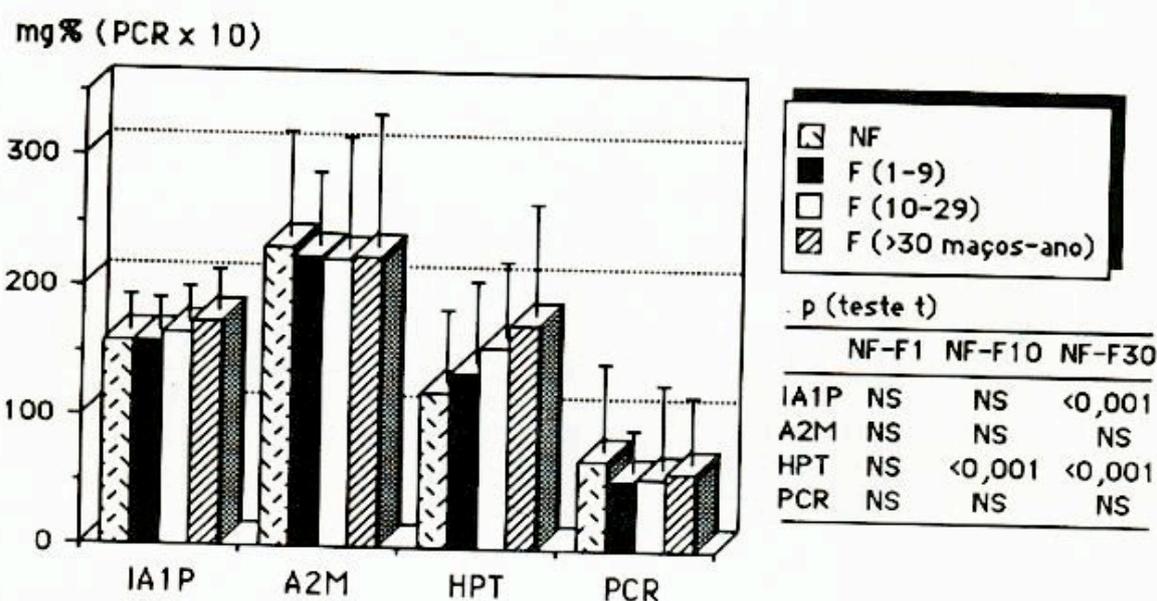


Fig. 10 — Estudo, no soro, da concentração de algumas proteínas da resposta inflamatória, discriminado por três escalões de carga tabágica (F1, F10 e F30).

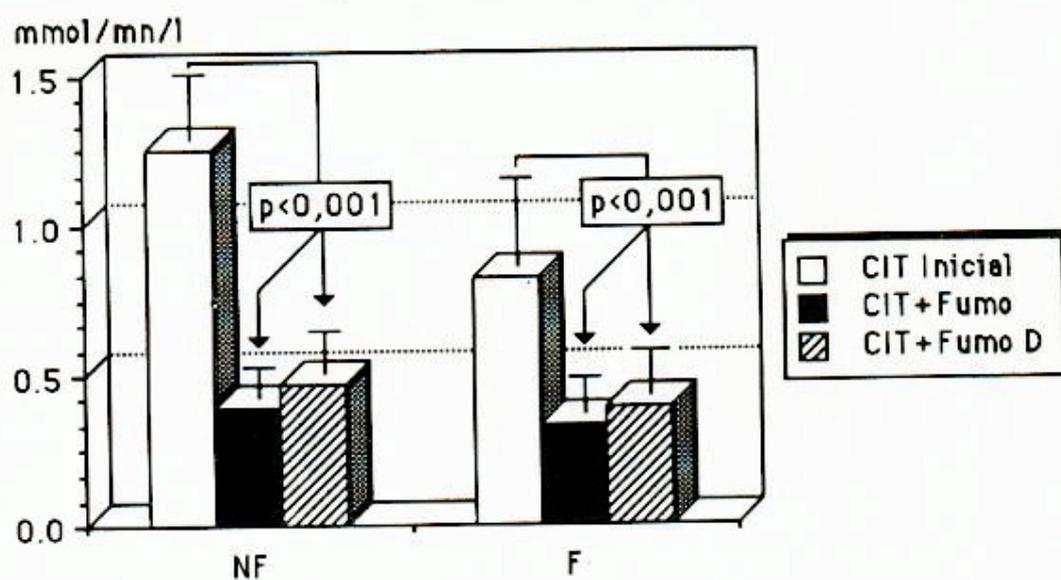


FIG. 11 — Estudo da influência do fumo de tabaco sobre a CIT de LLBAs de Fumadores (F) e de Não Fumadores (NF). São apresentados os valores da CIT inicial, após a acção directa do fumo de tabaco (CIT + Fumo) e após a acção do fumo de tabaco misturado com o ar atmosférico (CIT + Fumo D).

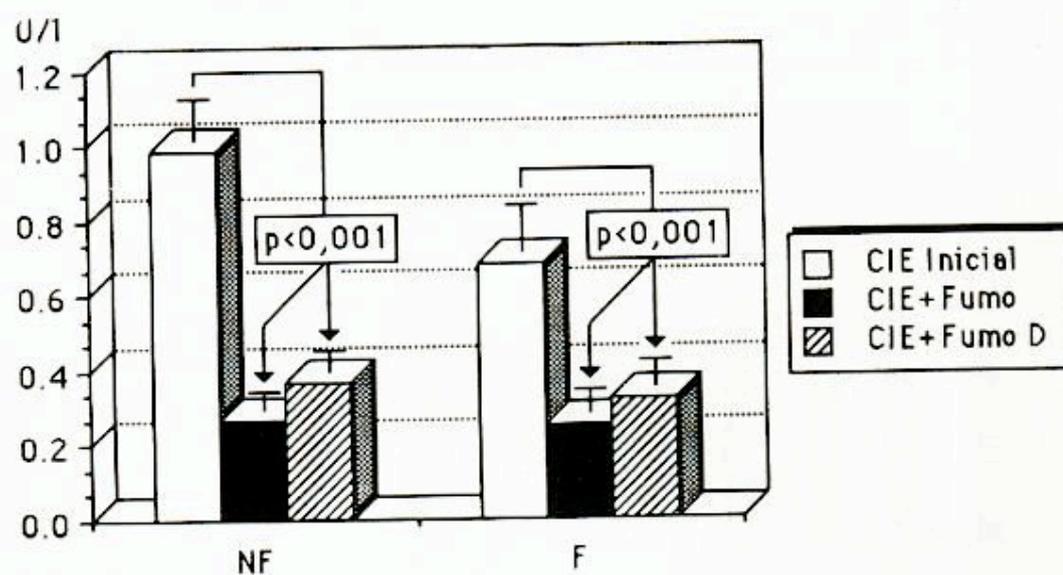


FIG. 12 — Estudo da influência do fumo de tabaco sobre a CIE da LLBAs de Fumadores (F) e de Não Fumadores (NF). São apresentados os valores da CIE inicial, após a acção directa do fumo de tabaco (CIE + Fumo) e após a acção do fumo de tabaco misturado com o ar atmosférico (CIE + Fumo D).

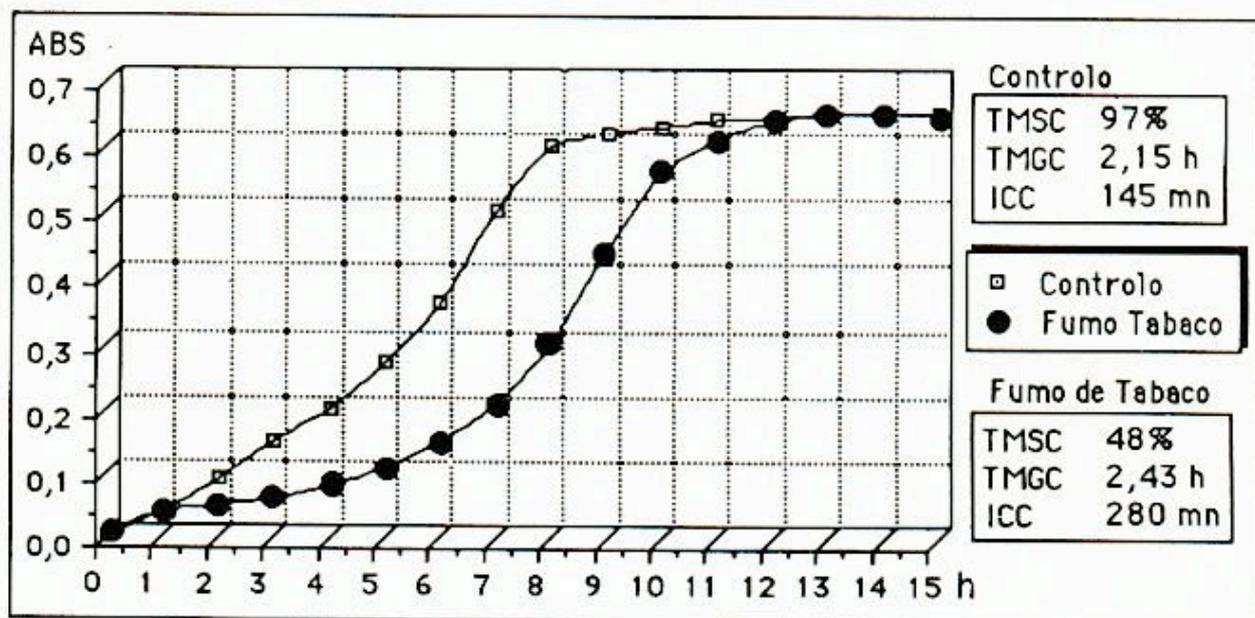


FIG. 13 — Estudo da influência do fumo de tabaco no desenvolvimento celular da *Salmonella typhimurium* TA100 (análise da Absorvância — ABS — das culturas).

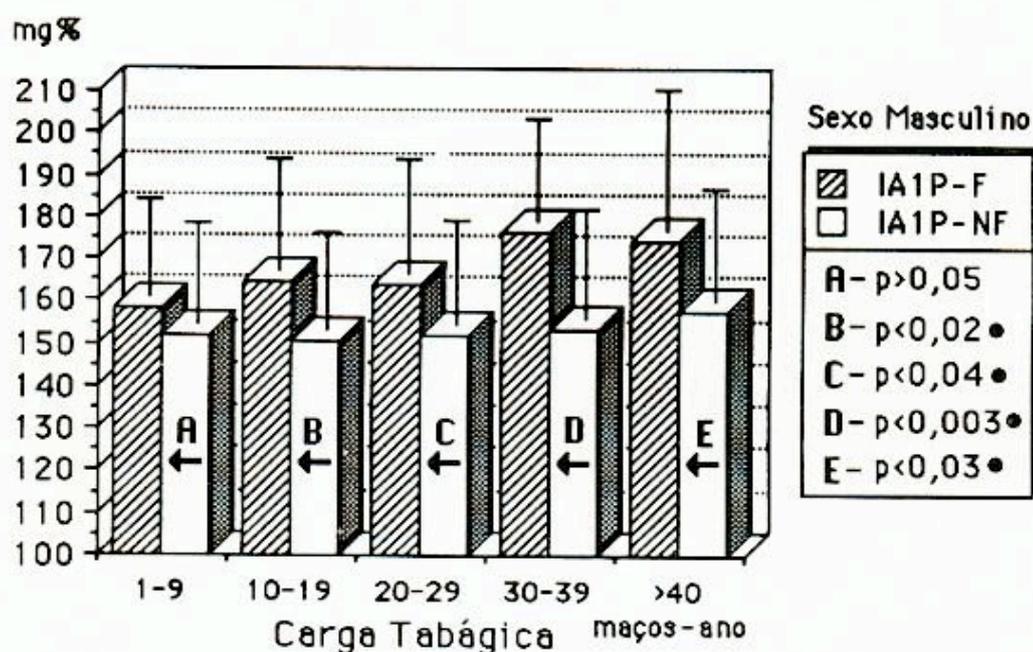


FIG. 14 — Estudo da concentração, no soro, do IAIP em Fumadores (F) e Não Fumadores (NF) equiparados, individualmente, por idade e sexo.

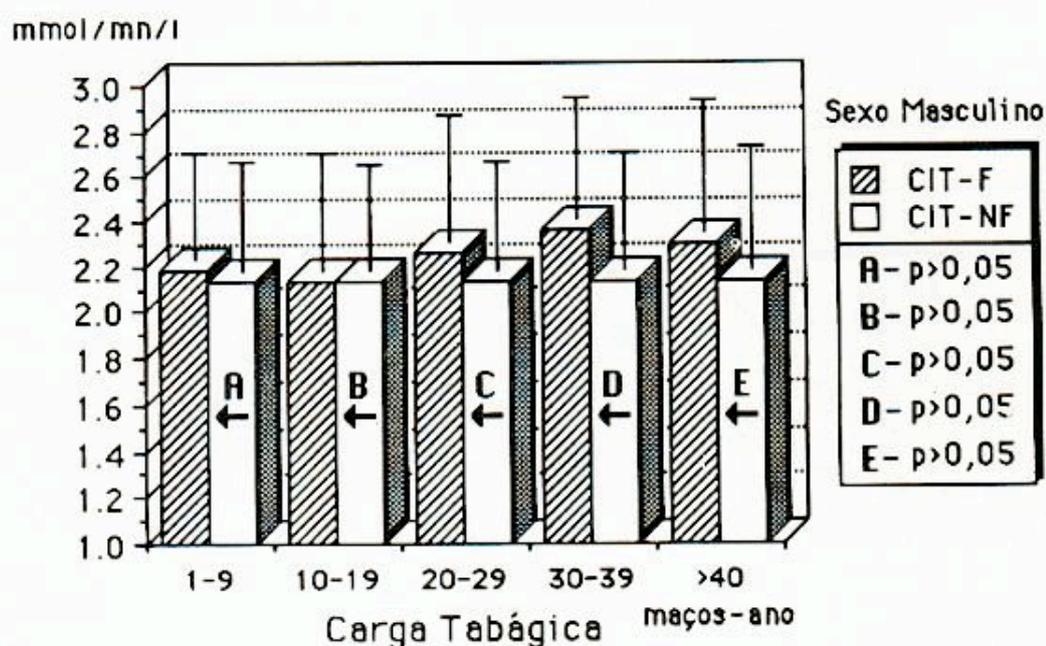


FIG. 15 — Estudo da CIT, no soro, em Fumadores (F) e Não Fumadores (NF) equiparados, individualmente, por idade e sexo.

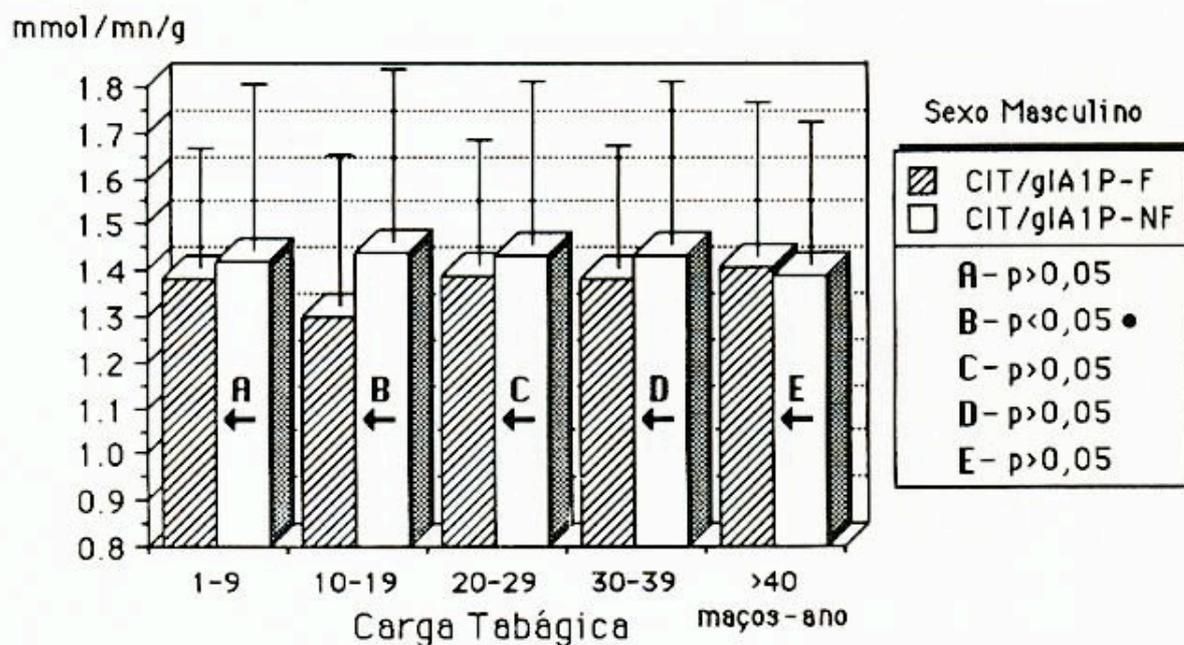


FIG. 16 — Estudo da CIT/gIA1P, no soro, em Fumadores (F) e Não Fumadores (NF), equiparados, individualmente, por idade e sexo.

4 — Estudo da acção do fumo de tabaco sobre o desenvolvimento celular *in vitro*

As curvas de desenvolvimento celular da *Salmonella typhimurium* TA100 estão representadas na Fig. 13, a par da indicação dos parâmetros básicos do crescimento celular. Evidencia-se um atraso importante no início do crescimento celular sob a acção do fumo de tabaco (280 mn, contra 145 mn do controlo), um TMGC mais elevado (2,43 h, contra 2,15 h) e uma TMSC de, apenas, 48%, contra 97% do controlo.

Ainda na Fig. 13 pode verificar-se que, no caso da adição do extracto salino de fumo de tabaco, as *Salmonellae* necessitaram de cerca de 11 h para atingirem o crescimento máximo identificável com o equipamento utilizado, contra cerca de, apenas, 8 h para o controlo.

IV — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Parece fundamental uma chamada de atenção para a necessidade de uma definição cuidadosa dos grupos estudados, uma vez que diferentes características, como as de idade e sexo, podem alterar, significativamente, os resultados delas dependentes. Neste sentido, é por demais evidente a alteração sofrida nos valores da concentração sérica do IA1P no Grupo I, quando da utilização conjunta dos sexos masculino e feminino ($168,8 \pm 30,7$ mg% nos não fumadores, contra $167,7 \pm 29,3$ mg% nos fumadores, — diferença não significativa —) e, apenas, do sexo masculino ($157,6 \pm 27,2$ mg% nos não fumadores, contra $165,7 \pm 27,5$ mg% nos fumadores — $p < 0,001$).

A resposta inflamatória humoral (ao ser avaliada pelo comportamento sanguíneo do IA1P, da A2M, da HPT e da PCR) encontrava-se estimulada nos fumadores, de uma forma, predominantemente, crónica (aumentos da HPT e do IA1P, sem alteração da PCR).

A resposta imunitária humoral (analisada pela concentração sanguínea das IgG, A, M e E) mostrava-se, genericamente, deprimida nos fumadores (diminuição da IgG e da IgM), embora a IgE se encontrasse aumentada.

Estes aspectos parecem confirmar a tradução sistémica da acção do fumo de tabaco, particularmente através de uma estimulação crónica da resposta inflamatória e de uma depressão da resposta imunitária.

A diminuição da CIT/gIA1P nos fumadores com um consumo cumulativo de tabaco entre 10 e 19 maços-ano, resultou do aumento do nível sérico do IA1P e da diminuição da CIT (alterações não significativas, encontradas no referido escalão de hábito tabágico). Ao analisar-se a distribuição, por

idade, deste subgrupo, verificou-se que a idade média era de 36 ± 8 anos e que 65% dos indivíduos tinham idades compreendidas entre os 30 e os 39 anos. Ora, esta idade média era significativamente inferior à dos não fumadores ($p < 0,05$), o mesmo acontecendo noutros escalões de consumo de tabaco (o de 1 a 9 maços-ano tinha uma idade média significativamente inferior à dos não fumadores e os de 30 a 39 e superior a 40, uma idade mais elevada).

Assim, seria possível que as diferenças de idade encontradas nos escalões já assinalados de consumo de tabaco pudessem influir na concentração e actividade do IA1P, mascarando, ou distorcendo as verdadeiras influências do fumo de tabaco.

Com a finalidade de esclarecer esta situação duvidosa, analisaram-se os valores do IA1P, da CIT e da CIT/gIA1P em fumadores do sexo masculino (divididos nos subgrupos antes discriminados) comparativamente aos valores dos mesmos parâmetros encontrados em não fumadores do mesmo sexo, equiparados pela idade individual (200 fumadores, em relação a 200 não fumadores, equiparados, individualmente, por sexo e por idade).

Os resultados desta análise estão expressos nas Figs. 14, 15 e 16, sendo de assinalar a concentração do IA1P, significativamente aumentada nos fumadores com carga tabágica superior a 10 maços-ano, a ausência de variação da CIT e a diminuição da CIT/gIA1P nos fumadores com 10-19 maços-ano.

Parece, portanto, poder concluir-se que esta diminuição da actividade funcional, por unidade de massa do IA1P, esteja na dependência do hábito tabágico e seja motivada pelo aumento significativo da concentração do IA1P, não acompanhado pelo da CIT (inibição funcional).

Assim, foi evidenciável que a acção do fumo de tabaco no compartimento sistémico é diferente da no compartimento pulmonar, onde foi possível demonstrar, num trabalho anterior [9], uma diminuição significativa da CIT e da CIE nos fumadores.

A acção, «*in vitro*», do fumo de tabaco sobre a actividade funcional do IA1P foi, particularmente, observável na CIE e, também, ainda que em menor grau, na CIT. Contudo, quando da utilização de fumo de tabaco, previamente diluído com o ar atmosférico, os efeitos inibidores sobre a actividade funcional do IA1P foram muito menos marcados, levando a crer que o tabagismo passivo não deva ser considerado como um factor de tão alto risco na inactivação desta proteína e, portanto, no desencadeamento do enfisema e que, mesmo o factor de diluição fisiológica do fumo de tabaco, representado pelo compartimento orofaríngeo e traqueobroncoalveolar, possa atenuar «*in vivo*» o efeito do fumo do tabaco sobre o IA1P.

Finalmente, em relação à influência do fumo de tabaco (quando analisada através de um extracto salino) sobre o crescimento celular «in vitro», verificou-se uma intensa acção supressora do desenvolvimento celular (atraso do crescimento e morosidade de divisão celular) e um efeito citotóxico

crónico, traduzido por uma diminuição, significativa, da taxa média de sobrevivência celular. Tais efeitos parecem-nos da maior importância para a compreensão dos efeitos do tabagismo nas respostas orgânicas de defesa, nomeadamente nas suas vertentes celulares.

SUMMARY

Tobacco smoke seems to produce several changes in inflammatory and immune response not only in bronchoalveolar area but also in peripheral blood, although some points were not yet clarified. Concerning the inflammatory response the effect of tobacco smoke on the functional role of Alpha-1-Proteinase Inhibitor (IAIP) is of main importance; indeed tobacco smoke highly interacts with IAIP on deep lung, blocking the protease inhibitor capacity of this protein; however, in what extent this action takes place «physiologically», and is able to spread to systemic circulation is not yet full confirmed.

«In vivo» studies.

From a group of 929 individuals without clinical complains, randomly selected from North, Center and South Portugal, we studied serum humoral immune response (IgG, A, M and E antibodies), acute-phase protein response (IAIP, Alpha-2-Macroglobulin — A2M —, Haptoglobin — HPT — and C-reactive Protein — PCR —), and Trypsin Inhibitor Capacity (CIT); CIT/gIAIP was obtained mathematically by the formula: $CIT/gIAIP = CIT/IAIP \times 100$.

Males represented 61% of this group with a mean age of 40 ± 13 years; 36% were Smokers (F) with a mean cigarette consumption of 23.8 ± 20.8 packets-year. Females reached 39% with a mean age of 39 ± 17 years; 7% were smokers with a mean cigarette consumption of 5.3 ± 4.5 packets-year.

Analytical results showed a decrease on serum concentration of IgG and IgM and an increase on IgE levels in the subgroup of smokers. Some acute-phase protein (IAIP and HPT) levels were also increased in this subgroup. CIT was always identical in smokers and nonsmokers, but CIT/gIAIP was lower in smokers with a cigarette consumption of 10-19 packets-year when compared with Nonsmokers (NF) matched by age and sex.

«In vitro» studies:

Cigarette smoke action on bronchoalveolar lavage fluid:

Cigarette smoke was bubbled, directly and after dilution with atmospheric air, on Bronchoalveolar Lavage Fluid (LLBA) obtained from 17 healthy volunteers for bronchoalveolar lavage (smokers and nonsmokers). The results pointed to an important decrease of CIT and Elastase Inhibitor Capacity (CIE) after smoke action, specially if tobacco smoke was bubbled directly on the LLBA.

Cigarette smoke action on cell growth:

In order to obtain an automated assay to study the «in vitro» action of tobacco smoke on cell growth and differentiation we developed a special analytical protocol using a MutascreeenTM Analyse^r. In this protocol increasing amounts of a saline solution of cigarette smoke were mixed and incubated with Salmonella Thyphimurium TA100. Vertical spectrophotometry was performed during 24 hours, data being collected at intervals of 10 minutes. The results with saline solutions of tobacco smoke showed a delayed Start of Growth (ICC), an increased Mean Generation Time (TMGC) and a very depressed Mean Survival Ratio (TMSC).

These studies suggested an inhibitory action of tobacco smoke on humoral immune response, stimulation of acute phase proteins and an important «in vitro» depression of anti-protease IAIP function and of Salmonella cellular growth. This last action is particularly important if similar against human cells in order to better understand and discuss the cellular organic reactions to tobacco smoke.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARNAUD P.; GIANAZZA E. — Alpha-1-Antitrypsin — Protease Interactions: The Biological Aspect. em Marker Proteins in *Inflammation*, Vol. 2, 181-201, 1984.
- 2 — BIETH J. G. — The Antielastase Screen of the Lower Respiratory Tract — *Eur. J. Respir. Dis.*, 66 (Supl. 139), 57-61, 1985.
- 3 — BRIDGES R. B.; KIMMEL D. A.; WYATT R. J.; REHM S. R. — Serum Anti-proteases in Smokers and Nonsmokers; Relationships to Smoking Status and Pulmonary Function — *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132, 1162-1169, 1985.
- 4 — COX D. W., BILLINGSLEY G. D. — Oxidation of plasma Alpha-1-antitrypsin in Smokers and Nonsmokers by an Oxidizing Agent. — *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130, 594-599, 1984.
- 5 — FERA T.; ABBOUD R. T.; JOHAL S. S.; RICHTER A. M.; GIBSON N. — Effect of Smoking on Functional Activity of Plasma Alpha-1-Protease Inhibitor — *Chest*, 91, 346-350, 1987.
- 6 — HOLT P. G. — Immune and Inflammatory Function in Cigarette Smokers — *Thorax*, 42, 214-249, 1987.
- 7 — MAGNUSSON C. G. M. — Maternal Smoking Influences Cord Serum IgE and IgD Levels and Increases the Risk for Subsequent Infant Allergy — *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78, 888-904, 1986.
- 8 — ROBALO CORDEIRO A. J. A.; BAGANHA M. E.; SANTOS ROSA M. A.; GASPAR E.; LIMA M. A. M.; CARDOSO M. F. D.; GARÇÃO M. E.; SEGORGE Lufs A. J.; CARMO J. G. A. e LEITE A. C. P. — Aspectos Bioquímicos e Imunológicos da Repercussão do Tabaco sobre o Aparelho Respiratório — *Medicina Torácica*, 5, Sup., 37-53, 1982.
- 9 — SANTOS-ROSA M. A.; LEITE C. P.; ROBALO-CORDEIRO A. J. A. — Some Aspects of Pulmonary Inflammatory Reactions Relationships to Smoking Habit and Genetic Deficiency of A1PI — *Cóimbra Médica*, 8, Supl. 1, 79-82, 1987.