UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN ALCOHOLICOS CRONICOS CON Y SIN HEPATOPATIA

SALVADOR PALOMO GIL

GRANADA 1.990

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 19[illegible] a 19[illegible] Folio [illegible] Número [illegible]

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. [illegible], el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: [illegible]

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal el le calificó de [illegible]

Granada [illegible] de [illegible] de 19[illegible]

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: [illegible] Fdo.: [illegible]

EL VOCAL, EL VOCAL, EL VOCAL,

C. Juarez Fdez

Fdo.: [illegible] Fdo.: Fdo.:

FIRMA DEL GRADUANDO,

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE GRANADA

BLAS GIL EXTREMERA, PROF. TITULAR Y DIRECTOR DEL DPTO. DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

C E R T I F I C A:

Que D. SALVADOR PALOMO GIL, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado y concluido el Trabajo de Investigación "Inmunidad humoral y celular en alcohólicos crónicos con y sin hepatopatía", que preserta como Tesis Doctoral .

El que suscribe ha dirigido y revisado la presente Tesis Doctoral y queda conforme para su lectura y defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos expido y firmo la presente certificación en Granada, a diecisiete de septiembre de mil novecientos noventa.

A Menchu

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a:

Profesor Blas Gil Extremera, director de esta tesis, por el tiempo que ha dedicado y por la inestimable ayuda y consejos prestados en todo momento.

Francisco Caceres por su colaboración en el estudio estadístico.

José Leal Arenas y Emilio Prendes por su ayuda en la realización de tablas y dibujos.

José Salamanca Romero por su trabajo de mecanografia.

Todos los compañeros del Hospital de Riotinto por su colaboración.

A todos ellos, Gracias.

INDICE

PRIMERA PARTE: REVISION GENERAL DEL ALCOHOLISMO Y DE LA INMUNIDAD

Pag.

CAPITULO PRIMERO. "Alcoholismo"..... 8

1.1.- Epidemiología..... 9

1.2.- Metabolismo del alcohol etilico..... 10

1.3.- Efectos metabólicos y tóxicos..... 16

1.4.- Concepto de alcoholismo..... 29

1.5.- Marcadores biológicos de alcoholismo..... 35

CAPITULO SEGUNDO. "Sistema inmunitario"..... 38

2.1.- Concepto de inmunidad humoral y celular.. 39

2.2.- Linfocitos T..... 41

2.2.1.- Desarrollo..... 41

2.2.2.- Biología de las subpoblaciones T.. 43

2.2.3.- Estructura y ontogenia de los receptores..... 49

2.2.4.- Activación de células T..... 52

2.3.- Linfocitos B..... 57

2.3.1.- Generación de linfocitos B..... 58

2.3.2.- Reordenamiento y expresión de los genes de inmunoglobulinas..... 60

2.3.3.- Activación y diferenciación..... 66

2.3.4.- Receptores no inmunoglobulínicos.. 67

2.4.- Monocitos y Macrófagos..... 69

2.4.1.- Aspectos generales y del desarrollo..... 69

Pag.

2.4.2.- Activación..... 73

2.4.3.- Actividades funcionales..... 74

2.5.- Linfokinas..... 81

2.5.1.- Papel de las linfokinas en la respuesta inmune..... 82

2.5.2.- Interleukina 2..... 85

2.5.3.- Linfokinas implicadas en la activación de las células B..... 86

2.5.4.- Interferón..... 87

2.5.5.- Linfokinas que afectan a la hematopoyesis..... 88

2.5.6.- Interleukina 1 y factor de necrosis humoral..... 90

2.6.- Complejo Mayor de histocompatibilidad.... 93

2.7.- Sistema de complemento..... 95

2.8.- Visión integrada del sistéma inmunitario.101

2.9.- Valoración del sistema inmunitario.....108

CAPITULO TERCERO. "La inmunidad en el paciente Alcohólico".....117

3.1.- Inmunidad humoral.....118

3.2.- Función de los leucocitos polimorfonucleares.....119

3.3.- Función de los fagocitos mononucleares...121

3.4.- Inmunidad mediada por células.....122

SEGUNDA PARTE: APORTACION PERSONAL

Pag.

CAPITULO CUARTO. "Objetivos".....124

4.1.- Fundamentos y motivaciones.....125

4.2.- Objetivos.....126

CAPITULO QUINTO. "Material y Métodos".....129

5.1.- Material.....130

5.2.- Métodos.....134

CAPITULO SEXTO. "Resultados".....154

Tablas y figuras.....165

CAPITULO SEPTIMO. "Discusión".....201

CAPITULO OCTAVO. "Conclusiones".....239

CAPITULO NOVENO. "Bibliografía".....244

PRIMERA PARTE

REVISION GENERAL DEL ALCOHOLISMO Y DE LA INMUNIDAD

CAPITULO I

ALCOHOLISMO

1.1.-Epidemiología del alcoholismo.

El consumo de bebidas alcohólicas está extendido por todo el mundo con graves repercusiones económicas, especialmente en los países industrializados. Históricamente, ya en el libro del Génesis se hace referencia al vino y a la embriaguez.[152] En los países mediterráneos hay una auténtica cultura del vino ligada al cultivo de la vid. En los países del norte de Europa el alcohol se obtiene mediante la fermentación del arroz o de tubérculos diversos. Podemos decir que el alcohol ha existido en la humanidad probablemente desde el Neolítico, cuando el hombre comienza a ser sedentario y a cultivar la tierra.

En España, como consecuencia de ser un país productor de vino y del aumento del nivel de vida experimentado en los últimos años, el problema del alcoholismo es particularmente grave, ya que el consumo medio del alcohol ha ido aumentando progresivamente, pasando de un consumo de etanol puro per cápita de 8 litros a más de 13 litros en 1.980, siendo en Europa solamente superado por Francia[67].

En nuestro país, la tasa de consumo de vino se ha mantenido prácticamente invariable en los últimos 30 años, representando un promedio de 60 litros por habitante y año, pero se ha incrementado mucho el consumo de cerveza que ha pasado de menos de 10 litros

por habitante y año a 50 litros per cápita en 1.980.

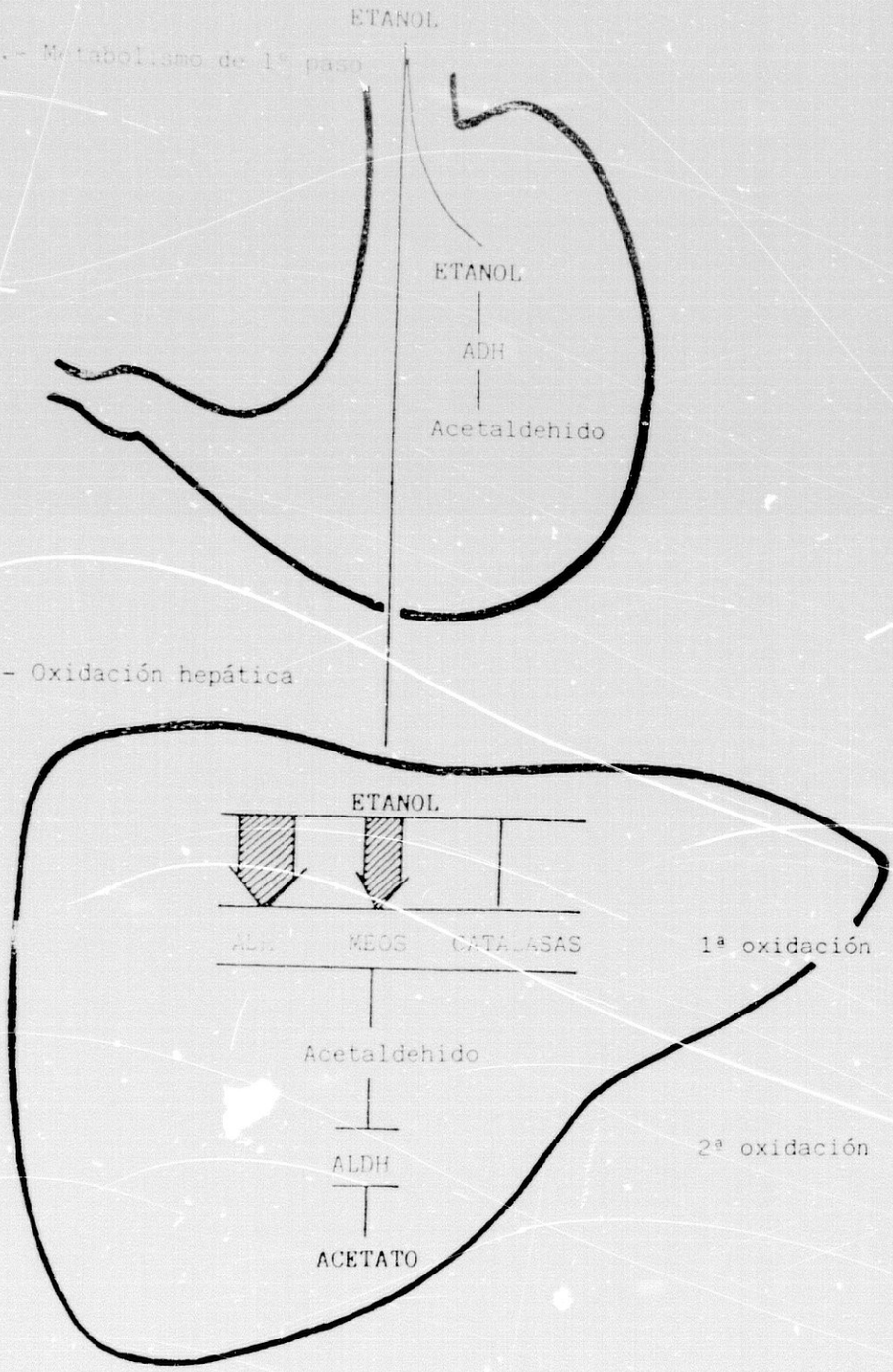
Además España también está entre los primeros países consumidores de destilados y licores alcohólicos, lo que representa un total de 7.5 litros de bebidas alcohólicas de 40º por habitante y año, por delante de todos los países de la Europa Occidental y EE.UU y únicamente superado por la URSS, Canadá y algunos países de la Europa Oriental[67].

1.2.- **Metabolismo del alcohol**.[103] (Figura I)

El alcohol etílico es fácilmente absorbido en el estómago y en el intestino delgado de manera que a los cinco minutos de la ingesta ya se detecta su presencia en la sangre y el máximo nivel se alcanza alrededor de los treinta. El etanol se distribuye por toda el agua corporal y después de un periodo de equilibramiento los niveles tisulares son similares a la concentración en sangre. Más del 80 % del alcohol absorbido es metabolizado en el higado, pulmones y piel. En el interior de la célula hepática el etanol sufre dos procesos oxidativos mediante los cuales pasa a acetato. El acetato pasa al torrente sanguíneo donde se incorpora en parte al ciclo de Krebs en forma de acetil Co A y el resto es metabolizado a CO_2 y agua.

El primer paso del metabolismo del etanol es su conversión a acetaldehido. En el hombre existen tres sistemas enzimaticos capaces de oxidar el etanol a

FIGURA I .- Metabolismo del alcohol etílico . Visión general



acetaldehido: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema oxidativo microsomal para el etanol (MEOS) y las catalasas.

La ADH es el principal enzima responsable de la oxidación del etanol in vivo.[101,103] Se encuentra en el citoplasma de las células hepáticas y requiere como cofactor al nicotinadenin dinucleótico (NAD) que se reduce aceptando hidrogeniones y pasando a NADH. La ADH también se encuentra, aunque a una concentración mucho menor, en otros tejidos como la mucosa gástrica e intestinal, los riñones y el cerebro. La ADH no es un enzima único sino que existen varios isoenzimas originados en varios locus genéticos distintos.

La distribución de los isoenzimas de la ADH varía según las especies, los individuos y los distintos tejidos. Este polimorfismo genético de la ADH podría ser uno de los factores responsables de la variedad de los efectos tóxicos del etanol según los individuos.

El sistema microsomal de oxidación para el etanol (MEOS) fue descrito por Lieber[103,104,107] y en principio su papel accesorio y adaptativo fue visto con excepticismo, aunque ha ido ganando progresivamente en aceptación y hoy se le atribuye un papel importante en el metabolismo y tolerancia al alcohol; tiene también una extraordinaria importancia en el metabolismo de muchas sustancias (fármacos, anestésicos, solventes orgánicos, etc).[105] El MEOS está localizado en el re-

ticulo-endoplásmico y depende del citocromo P 450. La fracción de citocromo P 450 inducido por el alcohol recibe el nombre de P 450 II E1.[129]. El papel del MEOS en condiciones normales es bajo ya que para su actuación precisa concentraciones superiores de etanol que la ADH. Por tanto la ADH se encarga de la metabolización del alcohol a niveles sanguíneos bajos (bebedor social). Pero durante el consumo crónico hay un incremento adaptativo del MEOS que coincide con una proliferación del retículo endoplásmico. Mediante isótopos se ha demostrado que el MEOS participa en la metabolización de alcohol en todos los niveles pero su papel es más importante cuando los niveles sanguíneos de alcohol son elevados.[4]

Los alcohólicos tienen una suceptibilidad aumentada a los efectos adversos de determinadas sustancias como son el tetracloruro de carbono, solventes industriales como el clorobenzeno y anestésicos debido a un mecanismo competitivo en su metabolización por el citocromo P 450.

En otros casos, como ocurre con la isoniacida y acetaminofen, el MEOS acelera su transformación en metabolitos que son tóxicos para el hígado.

Contrastando con la inducción producida por la administración a largo plazo de alcohol, en otras ocasiones se produce una inhibición sobre el metabolismo de ciertas drogas cuando se administra alcohol a corto

plazo (como ocurre con la metadona) enlenteciendose su metabolismo y aumentando por tanto las concentraciones en tejidos como hígado y cerebro.

Por último las catalasas, localizadas en los peroxisomas son capaces de oxidar el etanol in vitro en presencia de H_2O_2. Sin embargo, su acción está limitada por la cantidad de H_2O_2 generada y dado que la producción fisiológica de peróxido es bastante baja, la contribución de las Catalasas a la metabolización del alcohol in vivo no es significativa.

El segundo paso del metabolismo del etanol es la oxidación del acetaldehido a acetato.[102,103] El acetaldéhido también es metabolizado en el hígado principalmente a nivel de las mitocondrias por una enzima, la aldéhido deshidrogenasa (ALDH), que también precisa NAD como cofactor y que posee una alta afinidad por el etanol. En el citoplasma también hay otra ALDH cuya afinidad para el etanol es mucho más baja y su papel fisiológico poco significativo. Habitualmente durante el metabolismo del etanol los niveles plasmáticos de acetaldéhido son indetectables. Sin embargo, en el 50% de la población oriental se presenta acumulación de acetaldéhido en sangre periférica que se acompaña de enrojecimiento facial y taquicardia como consecuencia de la liberación de catecolaminas. Este fenómeno se debe posiblemente a la falta de la fracción mitocondrial de ALDH.

Los bebedores habituales toleran mejor la ingesta de una cantidad elevada de alcohol. Este hecho es debido en parte a una adaptación del S.N.C. y en parte a un metabolismo más rápido del etanol. Este fenómeno ha sido reproducido experimentalmente y el incremento del metabolismo del etanol puede llegar al 30-40%. El mecanismo postulado para este aumento del metabolismo de etanol es un inducción del MEOS. Otro mecanismo que también puede jugar algun papel es el aumento de la reoxidación del NADH, debido a un estado hipermetabólico del hígado, hecho que no ha sido comprobado por todos los autores.

Recientemente se ha demostrado que una fracción del alcohol ingerido no pasa a la circulación sistémica ni es retenido en el tracto gastrointestinal sino que es metabolizado a este nivel. Tanto la presencia de ADH en la mucosa gástrica como la capacidad de metabolizar alcohol en el estómago están bien documentadas in vitro, aunque se ha considerado que estos efectos tienen poca importancia en la práctica. Sin embargo, en la rata se ha demostrado que en la mucosa gástrica existe ADH suficiente para explicar la oxidación del 20% del etanol ingerido.[24] En el hombre también existe evidencia de este metabolismo de primer paso.

Por tanto, el metabolismo gástrico del etanol parece disminuir la biodisponibilidad de esta sustan-

cia y puede representar una barrera a su penetración modulando sus efectos sisteméticos y su toxicidad.[86] Después de la ingesta continuada de alcohol durante muchos años, la mayor parte de esta barrera se pierde,[53] un efecto que puede ser debido en parte a una disminución de la actividad de la ADH. La barrera gástrica es baja en mujeres contribuyendo a su mayor susceptibilidad al etanol. Los antagonistas H_2 disminuyen la actividad de la ADH gástrica aumentando los niveles de alcohol en sangre periférica.

1.3.-**Efectos metabólicos y tóxicos del etanol**.[103,122]

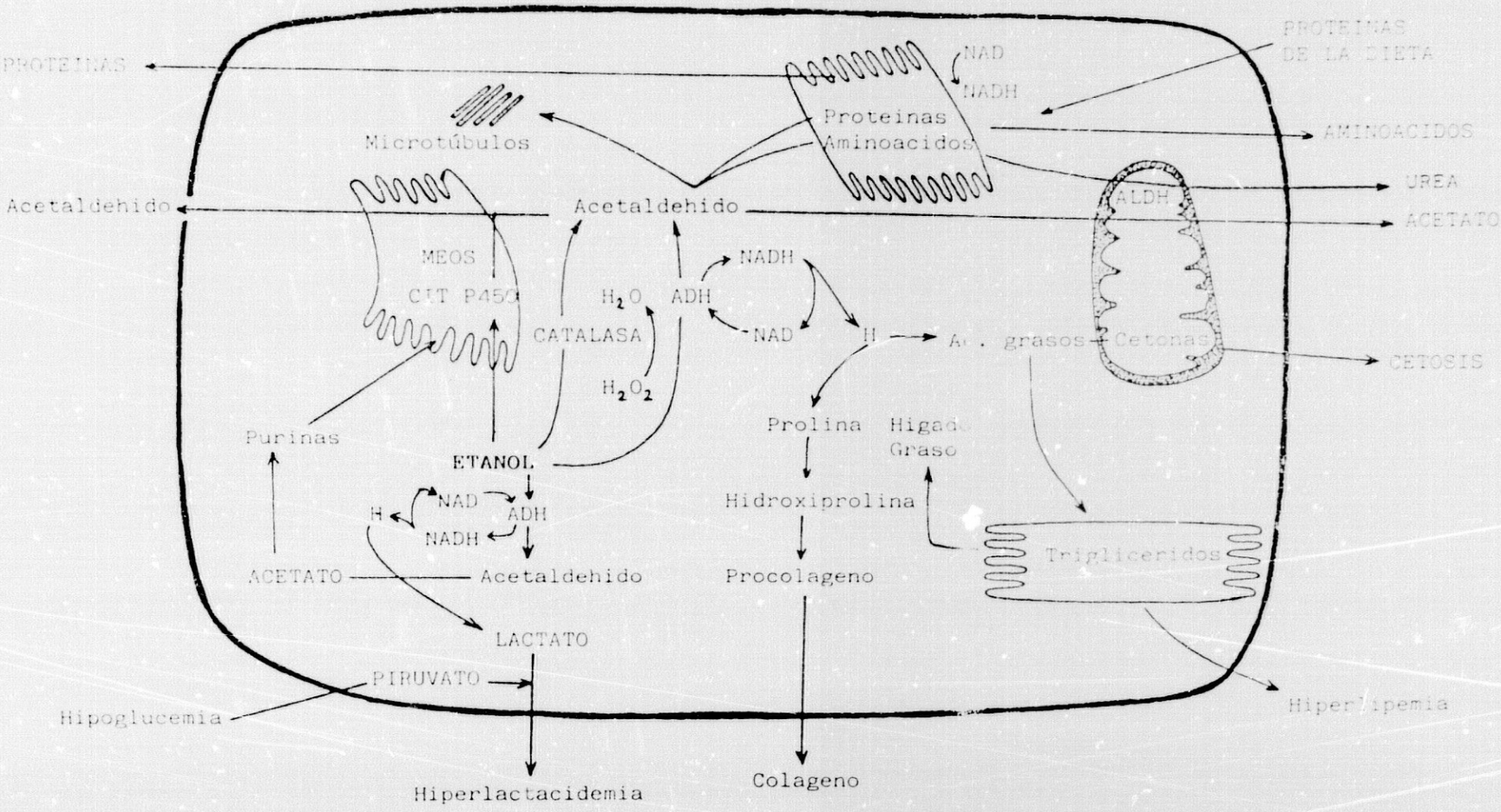
Los efectos metabólicos del etanol son debidos tanto a la desproporción del NDAH/NAD resultante de la oxidación del etanol y del acetaldéhido como al efecto del etanol y sobre todo del acetaldéhido sobre diversos sistemas enzimáticos (Figura II). La acción tóxica del acetaldéhido se debe a su estructura química que le confiere una gran capacidad para reaccionar con los grupos tiol y amino de las proteínas y de otros elementos que forman parte de las membranas celulares.[73]

1.3.1.-Efectos tóxicos derivados de la oxidación del alcohol por ADH:

1.3.1.1.- Alteraciones del metabolismo de los Hidratos de Carbono.

La administración de etanol al hombre puede dar lugar tanto a hipoglucemia como a hiperglucemia, de-

FIGURA II - Oxidación del etanol en el hepatocito



pendiendo del estado de los depósitos hepáticos de glucógeno. La hipoglucemia puede ser una complicación de la ingesta aguda de alcohol y la causa de algunas muertes súbitas que se producen en intoxicaciones agudas. La hipoglucemia marcada es poco frecuente en la clínica y es debida a una deplección de los depósitos de glucógeno y a una inhibición de la neoglucogénesis como consecuencia de un incremento de la relación NADH/NAD. La hiperglucemia es debida a una disminución de la utilización de glucosa y a una mayor liberación de glucosa a partir de las reservas de glucógeno medida por un estímulo adrenal y por el sistema nervioso simpático.

1.3.1.2.- Alteraciones del metabolismo de los lípidos.

La ingesta excesiva del alcohol se acompaña casi siempre de una esteatosis hepática secundaria a un depósito de triglicéridos y cuya causa es un aumento en el aporte de ácidos grasos al hígado.

El origen de estos ácidos grasos está en el tejido adiposo, en los lípidos procedentes de la dieta y en los lípidos sintetizados por el propio hígado. Los ácidos grasos proceden predominantemente del tejido adiposo tras la ingesta aguda de alcohol, mientras que en los casos de ingesta crónica se produce un aumento de las síntesis y una disminución de la degradación de los ácidos grasos en hígado.

También tras la ingesta crónica y como consecuencia del daño hepático, se produce una disminución en la síntesis y excreción de lipoproteinas. Uno de los resultados de la disminución de la oxidación de los cidos grasos puede ser la formación de cuerpos cetónicos y el desarrollo de cetoacidosis.

1.3.1.3.- Hiperlactacidemia e Hiperuricemia.[137,153]

El aumento de la relación NADH/NAD produce a su vez un aumento de la relación lactacto/piruvato e hiperlactacidemia generalmente moderada. La hiperlactacidemia puede dar lugar a una disminución de la excreción de ácido úrico a nivel del túbulo distal. La hiperuricemia suele ser transitoria aunque puede desencadenar un ataque de gota.

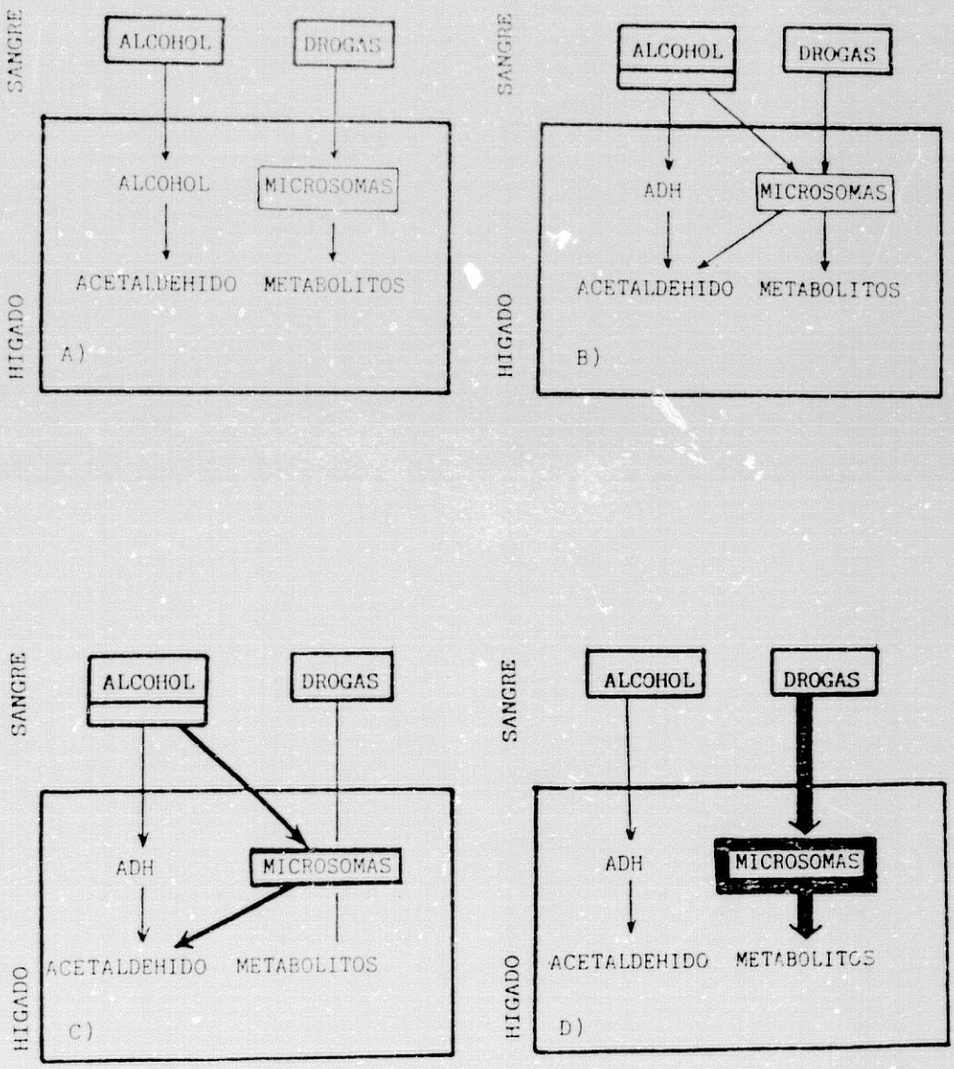
1.3.2.- Efectos tóxicos asociados con el MEOS.[105]

Derivan de interacciones del etanol con el metabolismo de otras drogas.(Figura III)

El alcohol puede modificar el efecto terapeutico, así como incrementar el efecto tóxico de determinadas sustancias. Ello se debe a su efecto inductor sobre el citocromo P 450. Así por ejemplo, esta acelerado el metabolismo de algunas sustancias que se metabolizan por este sistema, como pentobarbital, tolbutamida y tranquilizantes, aumentando la tolerancia a estas drogas. Otras sustancias como el tetracloruro de carbono aumentan su toxicidad en presencia del alcohol. Otras, como el acetaminofen, son metabolizadas en una pequeña

FIGURA III

Interacción del alcohol con drogas mediante alcohol deshidrogenasa y microsomas hepáticos.



proporción por el citocromo P 450 a una sustancia altamamente tóxica, que se produce en exceso cuando hay una inducción del sistema microsomal de oxidación del etanol. Igual ocurre con la isoniacida.

1.3.3.- Efectos tóxicos asociados con la formación de acetaldéhido.

1.3.3.1.- Formación de enlaces covalentes proteínas-acetaldéhido.

El acetaldéhido es capaz de ligarse in vitro a determinadas proteínas de los microsomas hepáticos y esta capacidad es mayor a medida que se va induciendo el sistema de oxidación micromal[130] y esta misma capacidad se ha demostrado in vivo. Además, el acetaldéhido es capaz de formar enlaces con otras moléculas tales como proteínas circulantes (albúmina[54] y hemoglobina[168]) y macromoléculas hepáticas.

Estas uniones de acetaldéhido con macromoléculas pueden actuar como neoantígenos e inducir la producción de anticuerpos que han sido detectados en alcohólicos con hígado graso y fibrosis hepática inicial.[78] Estos anticuerpos pueden servir como marcadores de alcoholismo y perpetuar la lesión hepática.

Recientemente se ha descrito una actividad citotóxica directa (no mediada por mecanismos inmunológicos) en el sobrenadante de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos humanos cultivados en presencia de etanol y en el suero de 3 voluntarios sanos que

bebieron 500 ml. de vino durante 25-35 minutos.[186] Esta actividad citotóxica se debe a la existencia de proteinas citotóxicas no dializables. Duró más de 10 horas despues de detener el consumo de alcohol, cuando ya los niveles de alcoholemia eran bajos. La aparición de esta macromolécula de acción citotóxica prolongada puede tener importancia en la producción de lesión tisular.

1.3.3.2.- Alteraciones estructurales de las mitocondrias y membranas plasmaticas.

En las mitocondrias hepáticas de los alcohólicos se aprecian unas alteraciones al microscopio electrónico (hinchazón y cristales anormales) que se asocian con alteraciones funcionales (disminución de la oxidación de ácidos grasos y acetaldéhido y una reducción de la actividad citocromo-oxidasa, capacidad respiratoria[106] y fosforilación oxidativa.[8] Estas alteraciones se deben a suceptibilidad de las mitocondrias al acetaldéhido.[114]

Se ha propuesto que los cambios funcionales en las mitocondrias pueden estar relacionados con alteraciones en las membranas plasmáticas.[181] Una opinión habitual es que la administración aguda de alcohol hace a las membranas más fluidas mientras que la administración crónica da lugar a una disminución de la fluidez y esto se considera una adaptación al efecto fluidificante inicial. La incubación de los hepatoci-

tos con alcohol da lugar a la liberación de fosfatasa alcalina sugiriendo que el aumento de fosfatasa alcalina observado en el consumo crónico de alcohol puede ser debido, al menos en parte, a una labilidad incrementada de esta enzima de membrana plasmática.[189] La actividad de otra enzima de membrana plasmática, la gam-
maglutamil transpeptidasa, esta también frecuentemente elevada en el suero de alcohólicos y ha sido usada como uno de los marcadores biológicos de alcoholismo,[102] aunque actualmente está siendo sustituida por otros marcadores con mayor sensibilidad y especificidad como la transferrina deficiente en carbohidratos.[14]

1.3.3.3.- Peroxidación de lípidos: alteraciones en el glutatión y metabolismo del hierro.

La capacidad del acetaldéhido para causar peroxidación de lípidos ha sido demostrada en hígados aislados y perfundidos y se ha relacionado con la oxidación del acetaldéhido.[124,163]

Además la unión del acetaldéhido con cisteina o glutatión-cisteina puede contribuir a la disminución de glutatión hepático.[163] En ratas a las que se les administra etanol durante largo tiempo existe un "turnóver" incrementado de glutatión en asociación con una actividad incrementada de gammaglutamiltranspeptidasa. La administración de etanol durante poco tiempo puede inhibir la síntesis de glutatión. La disminución del

glutatión hepático ocurre predominantemente en el compartimento mitocondrial y puede contribuir a la lesión orgánica y funcional inducida por el alcohol en las mitocondrias.

La ferritina proporciona el hierro necesario para la peroxidación lipídica. El hierro es movilizado para su reducción; el NADH generado en la oxidación del alcohol puede jugar aquí un papel reductor.[164] El hierro hepático no dependiente de la hemoglobina está aumentado después del consumo crónico de alcohol y los niveles séricos de ferritina se han encontrado elevados después de una ingesta alcohólica excesiva, significativamente más en los que tienen hepatopatia alcohólica que en los que no la tienen.

1.3.3.4.-Efecto del acetaldéhido sobre la actividad enzimática.

Un modo de toxicidad del acetaldéhido puede implicar interferencia con determinadas actividades enzimáticas.[166] Pequeñas cantidades de acetaldéhido pueden interferir con la reparación de nucleoproteínas.

1.3.3.5.-Fibrogénesis.

La lesión hepática por alcohol inicia una respuesta fibrótica con un anillo perivenular de fibrosis en asociación con proliferación de fibroblastos.

En cultivos de fibroblastos, el acetaldéhido incrementa la síntesis de colágeno y de RNA mensajero.[158]

1.3.4.- Mecanismos inmunológicos.

Los mecanismos inmunológicos han sido también estudiados como responsables de la lesión hepática por el alcohol. Se han detectado anticuerpos dirigidos frente a componentes de los hepatocitos alterados por el alcohol en el suero de pacientes con hapatopatía alcohólica.[7]

La hialina alcohólica de Mallory, una citokeratina anormal cuya presencia puede indicar una deficiencia de vitamina A, ha sido considerada capaz de producir una respuesta inmune.[65]

También se ha desmostrado una actividad citotóxica de las células mononucleares frente a células hepáticas autólogas, tanto en alcohólicos como en animales de experimentación, con implicación de células T y de células no T[142] que puede contribuir a la lesión hepática.

La generación de radicales libres por los neutrófilos puede proporcionar otro mecanismo potencial de injuria celular en enfermedad hepática alcohólica aguda.[188] Esta hipótesis esta basada en la observación de que las membranas de los hepatocitos alteradas por el acetaldéhido estimula a los neutrófilos a producir anión superóxido.

1.3.5.- Formación de ésteres etílicos.

El etanol es capaz de formar ésteres etílicos in vivo. Lapotasa y Lange[95] encuentran que la concentración de ésteres etílicos de ácidos grasos en el páncreas, hígado, corazón y tejido adiposo eran significativamente más alta en sujetos con intoxicación alcohólica aguda que en controles. Puesto que este metabolismo no oxidativo del alcohol se produce fundamentalmente en los órganos más frecuentemente afectados por el abuso de alcohol y puesto que algunos de estos órganos carecen de un sistema de metabolización oxidativa del alcohol, se ha postulado que estos ésteres etílicos de ácidos grasos y su metabolismo pueden jugar una parte en la producción de lesión por alcohol etílico.

1.3.6.- Factores nutricionales.

Hasta hace dos décadas se pensaba que la malnutrición primaria (debida a deficiencias de la dieta) era la principal causa de enfermedad hepática en el alcohólico. Pero a medida que ha ido mejorando la nutrición de la población, se ha prestado más atencion a la malnutrición secundaria resultante de la maldigestión y malabsorción producida por el consumo crónico de alcohol.[102,103] Esto incluye malabsorción de tiamina y folatos.

Los alcohólicos tienen un déficit de vitamina A en el hígado incluso aunque no haya déficit de Vita-

mina A en la dieta y los niveles sanguíneos de Vitamina A sean normales.[98] Esto refleja en parte una degradación microsomal acelerada y una movilización aumentada de la Vitamina A. La deplección de Vitamina A produce lesión lisomomal[99] y probablemente influya en la formación de los cuerpos hialinos de Mallory.[65] Por ello a los cirróticos debe suministrárseles un suplemento de Vitamina A no solo para evitar emeralopia e impotencia sexual sino para prevenir un posible daño hepático. Sin embargo, un exceso de Vitamina A puede ser hepatotóxico ya que grandes cantidades de Vitamina A pueden producir alteraciones en las mitocondrias, fibrosis y cirrosis y este efecto está potenciado en los alcohólicos.

El déficit protéico, cuando lo hay, debe ser corregido (si no hay encefalopatía hepática) ya que la hipoproteinemia tiene efectos adversos sobre el metabolismo del alcohol y puede potenciar la capacidad lesiva de este sobre el hígado.[102,187]

Se ha demostrado también que la deficiencia hepática de zinc se relaciona con una mayor actividad de la enzima prolil hidroxilasa y que esto puede favorecer los procesos de fibrogénesis hepática.[135]

1.3.7.-Posible toxicidad de otros componentes de las bebidas alcohólicas.

Excepto en el caso de bebidas adulteradas que puedan contener arsénico, plomo u otros metales, no se

conocen otros componentes de las bebidas que puedan ser lesivos y el daño se debe de modo directo o indirecto al consumo de bebidas alcohólicas.[60]

Las crisis hipertensivas que se observan en pacientes tratados con inhibidores de la monoamino-oxidasa se deben a la existencia en las bebidas alcohólicas de sustancias que como la tiamina y la DOPA incrementan la liberación de noradrenalina. Si bien las crisis de rubefacción que se observan en algunos pacientes, en especial orientales, se relacionan con el metabolismo del acetaldéhido, las crisis de angioedema y urticaria que ocasionalmente se producen se deben a la existencia de levaduras y conservantes en las bebidas.

1.4 Concepto de alcoholismo.

El alcoholismo es una enfermedad progresiva caracterizada por una pérdida de control sobre el consumo de alcohol, que puede producir una amplia variedad de manifestaciones, tanto desde el punto de vista somático como de conducta. Su definición resulta difícil dada la multiplicidad de factores que interviene en el alcoholismo y su problemática debe ser abordada desde diferentes puntos.[5]

Los psiquiatras han estudiado ampliamente el problema con objeto de detectar la toxicomanía ya que es habitual que el alcohólico oculte su problema y esto es más acentuado en mujeres, de ahí la dificultad para diagnosticar el alcoholismo en el sexo femenino.

La Asociación Psiquiátrica Americana[6] enumera los criterios para el diagnóstico de trastorno por el abuso de una sustancia:

a) Interfiere con el cumplimiento de sus actividades laborales.
b) Crea problemas en la familia.
c) Da lugar a problemas en las relaciones sociales.
d) Ocasiona problemas legales.
e) Genera problemas médicos.

Con el objeto de detectar el alcoholismo se utilizan una serie de cuestionarios; los psiquiatras americanos utilizan con frecuencia el "Michigan Alcohol

Screening Test" en su versión reducida (SMAST)[141] que describimos en el Cuadro I.

En el ámbito hospitalario y en los Servicios de Urgencias se dispone de una oportunidad única para detectar el alcoholismo.[33] Cyr y Wartman[44] encuentran que los pacientes que han sufrido un accidente son una excelente oportunidad para detectar el alcoholismo. Cuando un adolescente o adulto ingresa por accidente, se le hacen las siguientes preguntas : ¿Ha tenido Vd. alguna vez un problema de bebida?, ¿Ha consumido Vd. bebidas en las ultimas 24 horas?. Una respuesta positiva a una de las preguntas tiene una sensibilidad del 91.5% y una respuesta negativa a ambas preguntas da un valor predictivo negativo del 97% y ello es debido probablemente al momento crítico en que se encuentra el paciente que le obliga a reconocer el problema en vez de seguir negándolo.

Desde el punto de vista somático se puede hablar de enfermedad alcohólica cuando se cumplen los siguientes requisitos.[146]

a) Adaptación del metabolismo celular al alcohol.
b) Adquisición progresiva de tolerancia hística.
c) Aparición de síntomas de abstinencia y de falta de control por parte del individuo.

Otra definición de alcoholismo[146] es aquella que considera alcohólico a aquel individuo que ingiere regularmente un 20% o más de las calorías totales de

CUADRO I.- CUESTIONARIO BREVE DE MICHIGAN PARA LA DETECCION SELECTIVA DEL ALCOHOLISMO.

PREGUNTA		PUNTOS
1.-¿Siente Vd. que es un bebedor normal?	NO	2
2.-¿Piensan sus parientes o amigos que es Vd. un bebedor normal?	NO	2
3.-¿Ha asistido alguna vez a una reunión de alcohólicos anónimos?	SI	2
4.-¿Ha perdido amigos, novia por la be-- bida?	SI	5
5.-¿Ha tenido problemas en el trabajo por la bebida?	SI	2
6.-¿Ha descuidado alguna vez a su familia u obligaciones durante dos o mas días por beber?	SI	2
7.-Despues de haber bebido mucho ¿Ha tenido alguna vez delirios, temblores, ha oido o visto cosas que no estaban?	SI	2
8.-¿Ha acudido alguna vez a alguien para que le ayude con la bebida?	SI	2
9.-¿Ha estado alguna vez en un Hospital por la bebida?	SI	5
10.-¿Ha sido multado alguna vez por conducir bebido?	SI	2

Puntuación 6: Probable diagnostico de alcoholismo

la dieta en forma de alcohol (las llamadas calorías vacías que aporta el alcohol al organismo).

Sin embargo, en la práctica y para relacionar un determinado problema orgánico con el consumo excesivo de alcohol, es mucho más importante considerar la cantidad diaria ingerida y el tiempo necesario para producir una enfermedad debida al alcohol.

En nuestro país, la escuela de Granada (Prof. Peña Yáñez y Prof. Rico Irles) ha estudiado en profundidad este problema, fundamentalmente en relación con el poder patógeno del alcohol sobre el higado[146] y ha considerado los siguientes grados de ingesta alcohólica:

-No peligrosa: La ingesta de menos de 80 g. de alcohol diarios.

-Peligrosa: La ingesta de 80-160 g. de alcohol diariariamente durante un periodo mínimo de 3 años.

-Muy peligrosa: La ingesta de más de 160 g. de alcohol al día durante un periodo mínimo de 3 años.

Esta graduación permite una mayor objetividad para unificar criterios a la hora de hablar de alcoholismo ya que sin referirse a la cantidad de alcohol ingerido, los resultados de los distintos estudios son muy dispares. Hay un estudio clásico realizado por Lelbach[97] que encuentra una correlación muy signifi-

cativa entre la cantidad de alcohol ingerido para el peso corporal y la prevalencia de cirrosis. Hay marcadas diferencias entre hombres y mujeres ya que el riesgo de desarrollar una patología alcohólica aún con un consumo menor de alcohol es mayor para las mujeres. En esta mayor suceptibilidad de las mujeres al poder patógeno del alcohol influyen varios factores: además de aspectos hormonales, puede influir la distinta distribución del agua corporal[174] y un menor metabolismo de primer paso por la alcohol deshidrogenasa gástrica.[86]

En la última década, tres investigaciones independientes han probado concluyentemente el carácter hereditario del alcoholismo.[13,35,180] Estos estudios han demostrado que la vulnerabilidad para este desorden se transmite desde el padre alcohólico a la descendencia, incluso cuando esta haya sido separada del padre al nacimiento y adoptada por padres no alcohólicos, y viceversa, la descendencia de padres no alcohólicos no muestra incremento en la vulnerabilidad aún cuando sea adoptada por padres alcohólicos. Cloninger[35] ha identificado dos tipos de alcoholismo hereditarios. El tipo I comienza después de los 25 años y está caracterizado por una dependencia sicológica severa y maldad. Ocurre tanto en hombres como en mujeres y requiere factores genéticos y ambientales para manifestarse. Por contraste, el tipo II de dependen-

cia del alcohol tiene su comienzo antes de los 25 años. Se caracteriza por incapacidad para retirarse del alcohol y por un conducta antisocial y frecuentemente agresiva, rara vez se da en mujeres y muestra un marcado componente hereditario.

Hay determinadas actividades enzimáticas alteradas en las plaquetas[170,180] (monoaminoxidasa) que están presentes en los descendientes de alcohólicos incluso antes de que se manifieste la enfermedad.

1.5.- Marcadores biológicos de alcoholismo.

Dada la rapidez de metabolización del alcohol, la alcoholemia no sirve como marcador del alcoholismo crónico, aunque sí de una ingesta alcohólica reciente.

La determinación de alcohol en orina mediante "tiritas", aunque prolonga más el tiempo para su detección, no tiene valor en el diagóstico de alcoholismo aunque si sirve para comprobar si un paciente cumple el tratamiento de abstención.

Los marcadores habitualmente usados en clínica[183] son el volumen corpuscular medio (V.C.M.) y la gamma-glutamil transpeptidasa (Gamma GT) que están aumentados en el alcoholismo e indican que el individuo tiene repercusión somática de la enfermedad. Otros marcadores que pueden utilizarse son los lípidos plasmáticos y la uricemia.

Cada uno de estos marcadores tiene poca sensibilidad y especificidad cuando se consideran por separado, pero cuando se consideran en conjunto aumenta su sensibilidad y especifidad. Whitehead[185] midio la Gamma GT, transaminasa aspartica, ácido úrico, triglicéridos y volumen corpuscular en 2.034 hombres sanos y encontró que la Gamma GT estaba elevada en el 14.9%, en el 8% la transaminasa aspártica y en un 4.2% ambos. Estos hallazgos eran idénticos en un subgrupo cuya ingesta alcohólica era conocida. Ambos enzimas, así como el ácido úrico y volumen corpuscular medio

mostraban un incremento progresivo a medida que incrementaba el consumo de alcohol.

Recientemente se ha estudiado el valor de la morfometria eritrocitaria como marcador biológico de alcoholismo por Gil Extremera y Co s,[66] demostrando que este parametro es un escelente marcador.

El cociente GOT/GPT se utiliza, mas que como marcador de alcoholismo,para sospechar que la causa de una hepatopatia es el alcohol cuando su valor es mayor de dos.[37]

Hay actualmente marcadores mucho más sensibles pero que no están al alcance de todos los laboratorios como son la determinación de anticuerpos frente a complejos de macromoleculas formadas por albúmina o hemoglobina y acetaldéhido que actúan como antígenos[78] o la determinación de transferrina deficiente en carbohidratos que está aumentada en alcohólicos crónicos.[14]

Recientemente están apareciendo marcadores que indican una predisposición hereditaria y que están presentes antes de que aparezca repercusión somática e incluso antes de que aparezca la toxicomania, como son alteraciones en los potenciales evocados auditivos y visuales[13] y una inhibición de la monoamino oxidasa plaquetaria por el etanol mucho más alta en los alcohólicos.[170,180]

Estos marcadores tienen mucho interes desde el punto de vista preventivo aunque necesitan ulterior

confirmación y no se dispone de ellos en la práctica diaria.

CAPITULO II

REVISION DEL SISTEMA INMUNITARIO

2.1.- Inmunidad humoral y celular:

El sistema inmunitario, mediante vías de reconocimiento estrechamente reguladas, desempeña un papel crucial en la defensa del cuerpo contra el establecimiento de factores exógenos y endógenos capaces de iniciar un estado patológico. Como este papel defensivo lo realiza el sistema inmunitario mediante mecanismos destructores, las vías de reconocimiento del agente nocivo y los mecanismos de regulación de la intensidad de la respuesta inmunitaria adquieren una función fundamental para evitar la lesión del organismo por la propia respuesta inmunitaria.

El sistema inmunitario consta de unos mecanismos de defensa naturales e inespecíficos y de otros mecanismos específicos. La inmunidad inespecífica brinda resistencia a la penetración y colabora en la destrucción de agentes que invaden los tejidos y en la eliminación de los residuos tóxicos y tiene extraordinaria importancia a nivel de piel y mucosas.[25] Ejemplos de inmunidad inespecífica son: la producción de moco, la acción mucociliar, la acidez gástrica, el peristaltismo intestinal, la flora habitual del intestino, enzimas liberados por los tejidos, etc. También las células fagocíticas y el complemento forman parte del sistema inmunitario inespecífico.

La inmunidad específica es con mucho la mas importante de todas y la mejor conocida. Está consti-

tuida por los linfocitos. Las funciones de los linfocitos se han atribuido a dos subgrupos de estas células: linfocitos B y linfocitos T, que se identifican por marcadores especificos en la membrana de superficie. Los linfocitos B, tras su estimulación y transformación en células plasmáticas, se encargan de producir anticuerpos y son los responsables de la inmunidad humoral. Los linfocitos T y B constituyen el 90-95% del total de los linfocitos, pero hay un 5-10% de linfocitos que no tienen marcadores de superficie que los identifiquen como células B y T y se les ha llamado células nulas; es probables que incluyan varias líneas celulares. Entre ellas se ha identificado una célula asesina natural (natural Killer) por su capacidad de fijar y destruir células cubiertas de anticuerpo mediante un receptor Fc de membrana que puede reconocer una parte de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

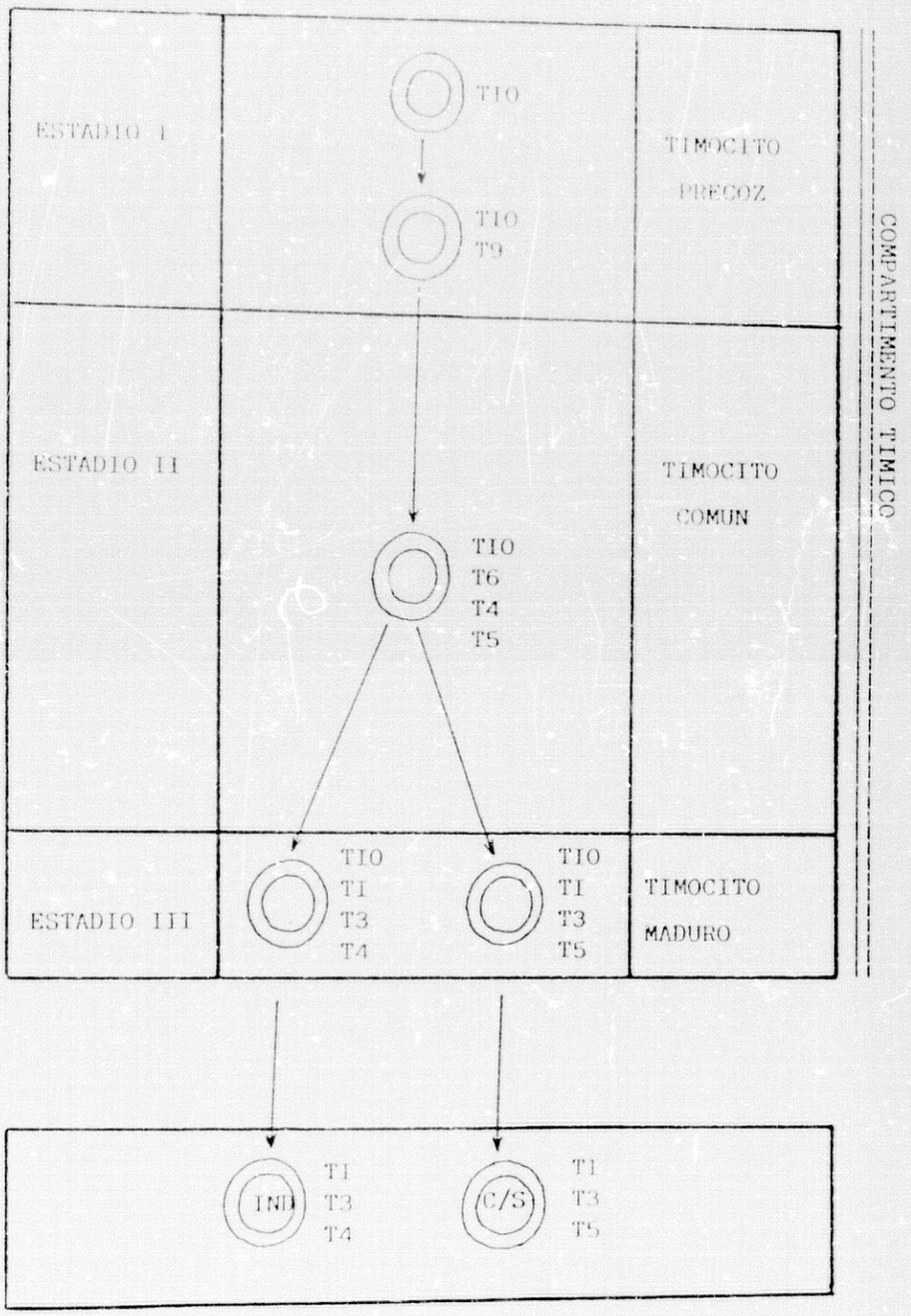
2.2.-Linfocitos T:

Los linfocitos T humanos están dotados de la capacidad de reconocer antígenos específicos, efectuar funciones efectoras y regular el tipo y la intensidad de todas las respuestas inmuno humorales y celulares.[150] Dos categorías funcionalmente distintas de linfocitos T se han separado mediante hetero-antisueros, autoanticuerpos y anticuerpos monoclonales dirigidos a los antígenos estables de superficie.[57] Ambas han sido programadas independientemente para sus respectivas funciones facilitadoras y supresoras citotóxicas durante su etapa intratímica.

2.2.1.-Desarrollo de los linfocitos T[151]

Es necesario un microambiente tímico para la diferenciación de las células T en todas sus especies. Parece ser que las células precursoras de la médula ósea (protimocitos) emigran a la glándula tímica donde son procesadas, se hacen inmunologicamente competentes y entonces son exportadas al compartimento linfoide periférico. Profundos cambios en los antígenos de la superficie celular marcan los distintos estadios de la ontogenicidad de las células T[144] (Figura IV). En el hombre las células linfoides iniciales llevan antígenos repartidos por algunas células de la médula ósea, pero le faltan los antígenos de las células T maduras. Esta población representa aproximadamente el 10% de los linfocitos tímicos y reaccionan con dos anticuer-

FICURA IV.- Desarrollo del linfocito T



pos monoclonales AntiTag, T_{10}. Con la maduración, eltimocito pierde el antigeno T_9, retiene el T_{10} y adquiere un antigeno distinto, el T_6. Habitualmente, estas células expresan antígenos definidos por anti T_4 y anti T_8. Estos timocitos T_{10}, T_6, T_4, T_8, suponen el 70% de la población tímica. Con una maduración posterior el timocito pierde el T_6 y adquiere los antígenos T_1 y T_3 y segregan T_4 y T_8. La competencia inmunológica es adquirida en este estadio (III) pero no se desarrolla totalmente hasta que el linfocito tímico es exportado. Fuera del timo, pierden el antígeno T_{10} y los linfocitos T_1, T_3 y T_4 representan a los linfocitos inductores y los T_1, T_3, T_8 a los linfocitos citotoxicos supresores.

2.2.2.- Biología de las subpoblaciones de linfocitos T [151] (Cuadro II)

La capacidad proliferativa de los linfocitos T a antígenos solubles (como la parotiditis o toxoide tetánico) se encuentra solo en el subtipo T_4. En cambio, ambos subtipos muestran capacidad de proliferación a los antígenos de superficie celular (aloantígenos) en cultivos mezclados de linfocitos. Además la población T_4 responde masivamente al mitógeno fitohemaglutinina, mientras que los T_8 muestran una respuesta menor. Ambas subpoblaciones, en cambio, responden comparablemente a la concavalina A.

CUADRO II.- Funciones inmunológicas de las subpoblaciones de células T.

Función	T_H	T_S
citotóxicas/represoras	(T_1 T_3 T_4)	(T_1 T_3 T_8)
Respuesta proliferativa		
a antígenos solubles	+	-
a cultivo mezclado de linfocitos	+	+
a concavalina A	+	+
a Fitohemaglutinina	+	+/-
Función efectora citotóxica	-	+
Eventos reguladores		
Inducción		
T-T	+	-
T-B	+	-
T-macrófago	+	-
Supresión		
T-T	-	+
T-B	-	+

Puesto que una de la funciones efectoras principales de los linfocitos T humanos es su capacidad para destruir células especificas para las cuales están sensibilizados, se determinó si esta capacidad citotóxica estaba restringida a uno u otro subtipo de las poblaciones de linfocitos T. El subtipo T_4, aunque es capaz de proliferar en respuestas a aloantígenos, no se mostró citotóxico cuando se separó después de sensibilizarse en cultivo mixto de linfocitos. En cambio, el subtipo T_8 mostró tener células asesinas citotóxicas.

Quizás las diferencias mas importantes entre los distintos tipos de células T sea su distinto efecto regulador sobre la respuesta inmune. Las células T_4 han mostrado proporcionar un efecto inductor en las interacciones T-T, T-B y T-macrófagos. Aunque las células T_4 no han mostrado efectos citotóxicos cuando se han separado después de estimulación alogénica en cultivo mixto de linfocitos, sí que son requeridas para un efecto óptimo del desarrollo de la citotóxicidad por las células T efectoras. Estos estudios han demostrado que las células T_4 tienen efecto facilitador en las interacciones T-T.

Otros estudios han demostrado que solo las células T_4 son requeridas para inducir a las células B a proliferar y diferenciarse en células plasmáticas que contienen inmunoglobulinas. Además, el factor mitogé-

nico de los linfocitos, que induce proliferación de los distintos subtipos de linfocitos y el factor facilitador (helper) de las células T_4 que induce a las células B a la síntesis de inmunoglobulinas, son producidos solo por el subtipo de células T4.[148] Estos hallazgos resaltan la importancia del subtipo T_4 y demuestran que los linfocitos T regulan la respuesta inmune en los seres humanos por medio de interacciones célula-célula así como por moléculas reguladoras biologicamente muy potentes.

El efecto regulador de los linfocitos T_4 no se restringe a las células linfoides. Las células T antigenicamente estimuladas producen factores estimuladores que modulan la producción de la célula madre eritroide in vitro y es probable que las células T_4 tengan un papel importante en la regulación de la hematopoyesis.[34] Otras linfokinas, como el factor activador de los osteoclastos, factor de inhibición de los macrófagos, factor estimulante de los macrófagos, linfotoxina, interferon, factor de transferencia e interleukina 2 (un factor de crecimiento de las células T) son producidas tambien por las células T_4 estimuladas.[38]

El subtipo de células T_8 comprende una población de células maduras con funciones supresoras. Después de su activación con concavalina A, suprime la respuesta proliferativa autóloga a aloantígenos. Este

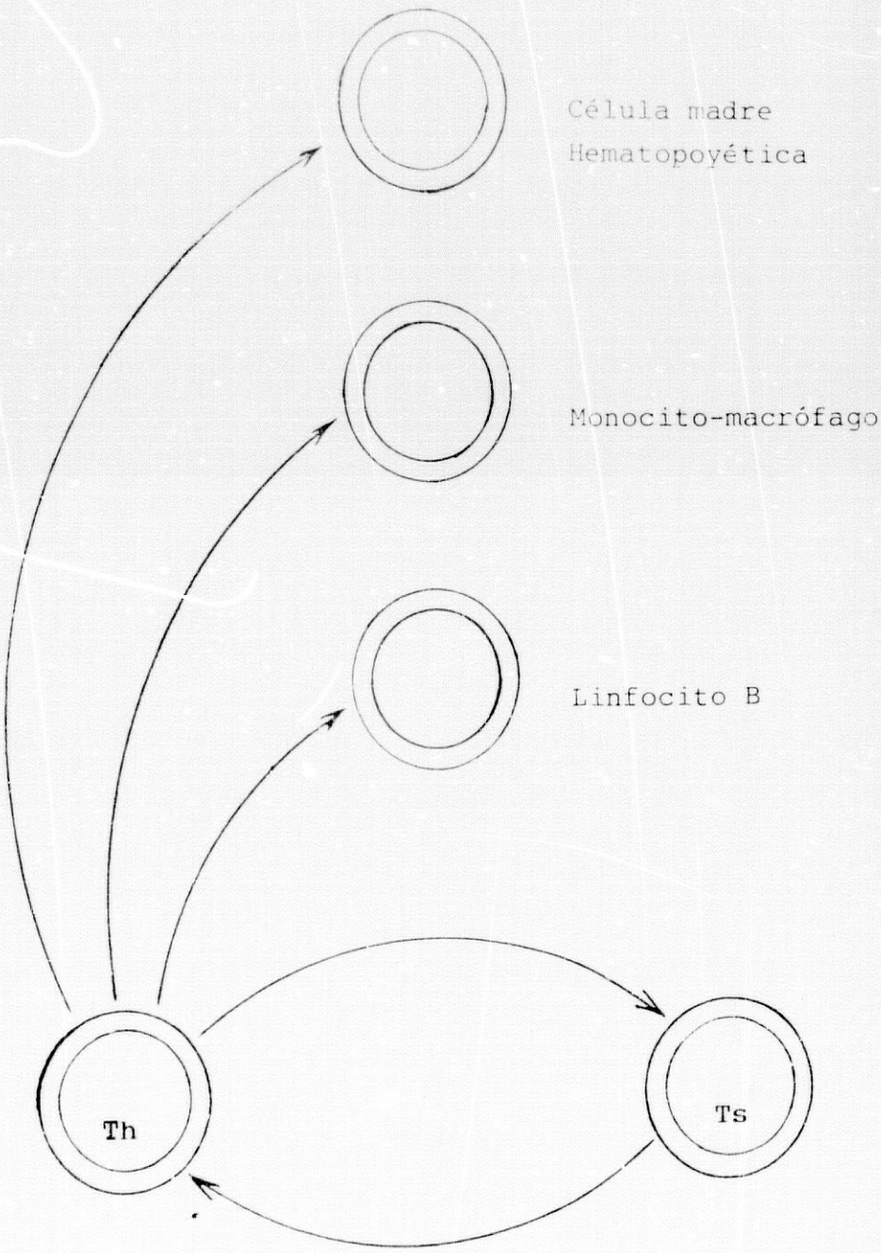
mismo subtipo suprime la producción de inmunoglobulinas por células B. Debe hacerse hincapié en que, aunque ambos T_4 y T_8 proliferan igualmente bién en respuesta a la concavalina A, solo la población T_8 se hace supresora. Estos resultados indican que las poblaciones T_4 y T_8 están programadas para sus respectivas funciones facilitadores (helper) y supresoras, independientemente de su capacidad para discriminar y reaccionar ante mitógenos y antígenos.

La complejidad del sistema regulador T ha aumentado con la creación de nuevos subtipos.[11] Con el sistema de células T supresoras (Ts) se ha demostrado la existencia de circuitos de células T que incluyen la activación de una célula inductora (Ts_1) encargada de inducir un supresor (Ts_2) que a su vez activa una célula efectora (Ts_3).

Todo este complejo sistema podemos esquematizarlo de forma sencilla como en la Figura V.

Las distintas poblaciones de linfocitos T pueden distinguirse por identificación de sus antígenos de superficie por medio de anticuerpos monoclonales[11,82] que pueden corresponder a la serie OK o serie Leu. Los linfocitos T totales son OKT1, OKT3 o Leu 1 y Leu 2. Los linfocitos T helper (facilitadores) son OKT4 y Leu 3; los linfocitos T supresores son OKT8 y Leu 2.

FIGURA V.- Interacciones célula-célula



2.2.3.- Estructura y ontogenia de los receptores de células T

Los linfocitos T, a diferencia de los linfocitos B, reconocen los antigenos predominantemente cuando estan asociados con productos de membrana del complejo mayor de histocompatibilidad (M.H.C.).[80] Este reconcimiento dual (antígeno y MHC) es importante tanto para las células T citotóxicas como para las células T inmunoreguladoras. Las células T citotóxicas lisan las células diana específicas, incluyendo células tumorales y células infectadas por virus, mientras que las células T inmunoreguladoras actúan como inductoras o supresoras para sus interacciones con otras células T, células B, macrófagos y otras células. La especificidad exquisita de las células T esta determinada por receptores de superficie celular distribuidos clonalmente.

Actualmente y gracias a técnicas de anticuerpos monoclonales ha sido posible estudiar la estructura del receptor par el antígeno y el MHC.

2.2.3.1.-Estructura del receptor Ti α-β de las células T

Estudios que han usado linfocitos T antígeno-especificos (clonados) y anticuerpos monoclonales dirigidos a varios componentes de sus glicoproteinas de superficie han identificado receptores de células T en el 95% de los linfocitos T como un complejo de super-

ficie que consta de un heterodímero clonotípico α-β, Ti, 90Kd y 3 moléculas T_3 monoméricas (γ, δ y ϵ)[118], [119]. Todas las subunidades del receptor son proteinas transmembrana. Al igual que ocurre con las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, las proteínas α y β contienen regiones variables (v) y regiones constantes (c)[2]

Parece que las subunidades T_1 forman un lugar de unión para el antígeno y el MHC a través de su porción variable, mientras que la subunidad T_3 cumple una función de transduccion de señal. Este complejo receptor multicadena no es diferente de otros receptores altamente evolucionados como los receptores de acetil colina o los receptores de insulina, en los cuales una cadena actúa como unión y otra cadena actúa con función de señalización.

La determinación directa de aminoácidos y el establecimiento de secuencias de proteínas derivadas de clones de $_c$DNA para codificar las subunidades Ti α y β han aclarado que la estructura de Ti es similar a la de las inmunoglobulinas y MHC sugiriendo que los tres tipos de moléculas evolucionan de la misma familia de supergenes.[58] Otros estudios sugieren que los genes que codifican diferentes receptores son similares a las inmunoglobulinas y que contienen elementos similares a las porciones variable (V), constante (C), unión (U) y diversa (D).

2.2.3.2.-Estructura del receptor Ti γ - δ de células T

Recientemente se ha identificado un complejo T_3 que no contiene el heterodímero Ti α-β. Este tipo de receptor, llamado Ti γ -δ [23], se ha identificado en líneas celulares interleukina 2 dependientes en pacientes con inmunodeficiencia por el síndrome del linfocito desnudo y de leucemia de células T. Un producto derivado del gen Ti γ, que es esencialmente similar en su estructura a otros genes de receptores de células T en su contenido V, U y C (con una variabilidad considerablemente mas limitada que α o β), asociado con las unidades T_3 y una quinta cadena Ti δ forman el receptor. En sangre periferica estas células T_3+Ti γ-δ constituyen numericamente una mínima fracción de linfocitos T y tienen una actividad similar a las células natural Killer.

2.2.3.3.-Ontogeneidad de los receptores:

Durante la maduración tímica se expresan las glicoproteinas T_4 y T_8 y se generan los subtipos celulares T_3+T_4 y T_3+T_8 que representan aproximadamente dos tercios y un tercio respectivamente de los linfocitos en sangre periferica. Una pequeña fracción de las células T periféricas y de los timocitos T_3 (<5%) carecen de T_4 y expresan el T_3-Ti γ-δ excepto algunos T_3+T_4-T_8. El subtipo T_4 contiene la amplia mayoría de los linfocitos T inductores y una minoría de células T citotóxicas, mientras que el subtipo T_8 contiene

la amplia mayoría de células T tanto supresoras como citotóxicas. Puesto que no hay isotipos funcionales en los receptores α- β de las células T, una de las dos regiones constantes α β puede ser usada en linfocitos T_4 y T_8. El análisis secuencial de las glicoproteinas de los receptores T_4 y T_8 ha mostrado que hay parte de la estructura del receptor que, a diferencia de las moléculas Ti o inmunoglubulinas, son invariables. Su papel parece ser unirse a las regiones invariables de la clase I (T_8) y clase II (T_4) del MHC y por tanto facilitar a interacción entre los linfocitos y las células diana incrementando la avidez por el contacto célula-célula. Por ello, la mayoría de las células T_4 demuestran especificidad por el antígeno y clase II de la molécula MHC y la mayoría de las células T_8 tienen especificidad por el antígeno y clase I de la molécula MHC. También se conoce que la molécula T_4 es un receptor para el virus de la inmunodeficiencia humana, explicando el tropismo de este virus por los linfocitos T_4.

2.2.4.-Activación de las células T:

La proliferación de células T ocurre como consecuencia de una serie de acontecimientos perfectamente orquestados que implican al complejo T_3-Ti, el factor de crecimiento interleukina-2 (también llamado factor de crecimiento de células T) y los receptores de interleukina 2.[120] Aunque las célula T en reposo no

expresan receptores para la interleukina-2, tienen un número máximo de receptores de superficie para el complejo antigeno-MHC (aproximadamente 40.000 por célula). Después de que los receptores de superficie sean disparados por antigenos y productos del gen MHC, el número de receptores de superficie para antigenos disminuye rapidamente y tiene lugar una inducción de receptores de superficie para la interleukina 2 en el plazo de horas. Tal activación también conduce a una inducción de secreción endógena de interleukina 2 en la misma célula. Una vez que un número crítico de receptores de interleukina 2 se han unido a esta sustancia comienza la síntesis de DNA y la mitosis celular. Posteriormente, en ausencia de una estimulación antigénica continuada, se produce una reexpresión de los receptores de superficie para antigeno T_3 y Ti y una reducción recíproca de receptores para interleukina-2.

Para que todos los acontecimientos que acabamos de decir ocurran de una manera exitosa, es necesario que estén presentes productos derivados de los macrófagos, incluyendo interleukina 1 (otra hormona polipeptídica).

De la relación receptores T_3-Ti y receptores interleukina-2 se deduce que un estímulo externo (por ejemplo un antígeno) dirige la magnitud y extensión de la proliferación de linfocitos T por medio del sistema de receptores de interleukina-2. En determinados de-

sordenes clínicos tiene lugar una alteración de este sistema, como ocurre con determinados tumores de células T inducidos por un virus linfototrópico de células T humanas tipo I. Estos tumores están expresando continuamente receptores de interleukina-2. Debe existir una posible relación de este mecanismo de crecimiento de células T con oncogenes aunque aún no se ha demostrado.

Recientes estudios indican que, igual que ocurre con el receptor T_3 Ti para el complejo antigeno-MHC, la glicoproteina de superficie que originalmente fue definida como proteina de unión de los hematíes de carnero para formar rosetas puede servir para facilitar la unión de linfocitos T con células blanco y actuar los linfocitos en reposo.[121] Este proceso de activación T_{11} puede ser iniciado por anticuerpos monoclonales dirigidos a zonas distintas del lugar de unión de los hematíes de carnero de la región extracelular de la molécula T_{11}. En principio se pensó que el estimulante natural de los receptores T_{11} era una linfokina pero esto no ha podido ser demostrado. Sin embargo,sí se ha demostrado que la LFA-3 (lymphocyte-function-associated antigen 3) que es una glicoproteina de superficie presente en células hematopoyéticas, es la unión con T_{11} facilitando el contacto célula-célula.[55]

La capacidad de la estructura T_{11} para desencade-

nar la activación de los linfocitos T en reposo, independientemente de los antigenos especificos y el MHC, puede ser un importante mecanismo intracelular e intercelular de ampliación que aumenta la respuesta inmune en ausencia de posterior estimulación antigénica. Puesto que estudios funcionales han evidenciado que ciertos anticuerpos anti T_{11} pueden activar a progenitores de lifocitos T, probablemente el T_{11} sea una estructura por la cual los timocitos son activados antes de que expresen el receptor de superficie T_3-Ti.[63]

Recientemente se han hecho grandes progresos para aclarar los acontecimientos moleculares iniciales en el proceso de transducción de señal. La estimulación de células T, bien sea por el complejo T_3-Ti o por T_{11}, da lugar a un gran incremento en las concentraciones de calcio libre citoplasmático. La mayoría del incremento del calcio citoplasmático resulta de un flujo transmembrana hacia el interior de la célula, indicando que hay unos canales de calcio en la membrana de los lifocitos que pueden ser regulados por estas glicoproteínas de superficie.[184]

En muchas células las señales externas son transducidas a través de un mecanismo lípidos-inositol hacia una amplia variedad de respuestas celulares, desde el almacenamiento de glucógeno hasta la fertilización. Esto también parece ocurrir en el caso de la activa-

ción de linfocitos T. En este mecanismo las señales externas se unen a un receptor, el cual transmite información a través de una proteína G para activar el fosfoinositol bifosfonato fosfodiesterasa. La fosfodiesterasa separa el fosfoinositol bifosfonato en un 2° mensajero: inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato, hidrosoluble, difunde al citoplama y libera calcio del reticulo endoplásmico.[93]

2.3.- Linfocitos B[69]

La línea de células B constituye uno de los principales enclaves del sistema inmune. Es la responsable de la inmunidad humoral y su principal función consiste en producir anticuerpos contra antígenos de microorganismos (proteínas o carbohidratos) toxinas y otras sustancias antigénicas potencialmente peligrosas para el organismo. Los anticuerpos pertenecen a nueve isotipos diferentes de inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2 e IgE), cada uno de los cuales tiene unas cualidades biológicas diferentes. Los anticuerpos IgM, que son sintetizados en primer lugar, son los mas eficientes en activar la cascada de proenzimas del complemento, cuyos elementos activos promueven la fagocitosis y destrucción de los microorganismos. Los anticuerpos IgG frente a microorganismos también se unen a receptores en las células fagocíticas y por tanto facilitan la destrucción fagocítica del microorganismo invasor. Además, los anticuerpos IgG maternos son selectivamente transportados a través de la placenta para proteger al niño. Los anticuerpos IgA son transportados selectivamente a través de las membranas mucosas para proteger frente a la invasión corporal a lo largo del tracto digestivo y respiratorio. Los anticuerpos IgA pueden también aclarar antígenos de la circulación por medio del transporte de complejos antígeno-IgA en la bilis. Los

anticuerpos IgE pueden estimular a los eosinófilos y basófilos por medio de sus receptores de superficie y estos liberan histamina y otros enzimas.

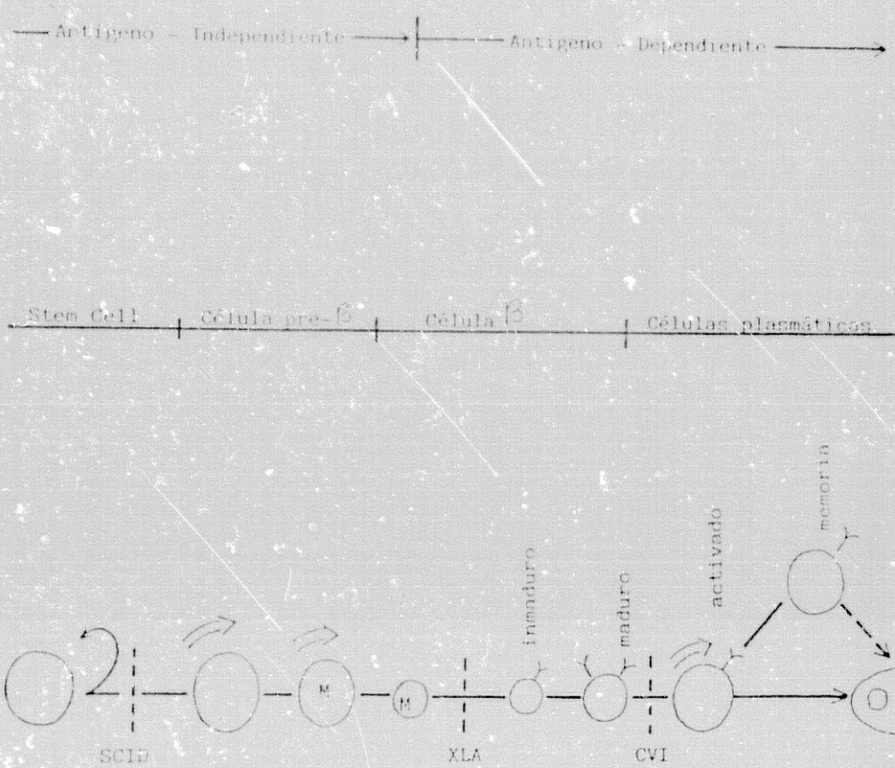
La historia de la vida de la línea B puede ser dividida en dos fases principales. Una fase inicial antigeno independiente (de la célula pre B al linfocito maduro) y una fase antigeno dependiente (del linfocito B la a célula plasmática productora de anticuerpos). Un bloqueo en lugares concretos de este desarrollo puede dar lugar a defectos inmunitarios congénitos o adquiridos.

2.3.1.- Generación de linfocitos B en tejidos hematopoyéticos.[39]

La fase pre B comienza cuando la célula madre pluripotencial toma el camino de las células B y termina varias generaciones mas tarde con la progenie de linfocitos B que expresan anticuerpos IgM de superficie(Figura VI). La entrada en la línea B se hace evidente cuando la célula madre hematopoyética emigra al higado embrionario durante la 8ª ó 9ª semana de gestación. Mas tarde en el desarrollo embrionario, cuando la célula madre puebla la médula ósea, las células pre B y su progenie de célula B son generadas aquí con otro tipo de células sanguíneas.

Dos procesos biologicamente complementarios son importantes en la generación de una grán población de células B que son clonalmente distintas en sus recep-

FIGURA VI . Diferenciación de las células B



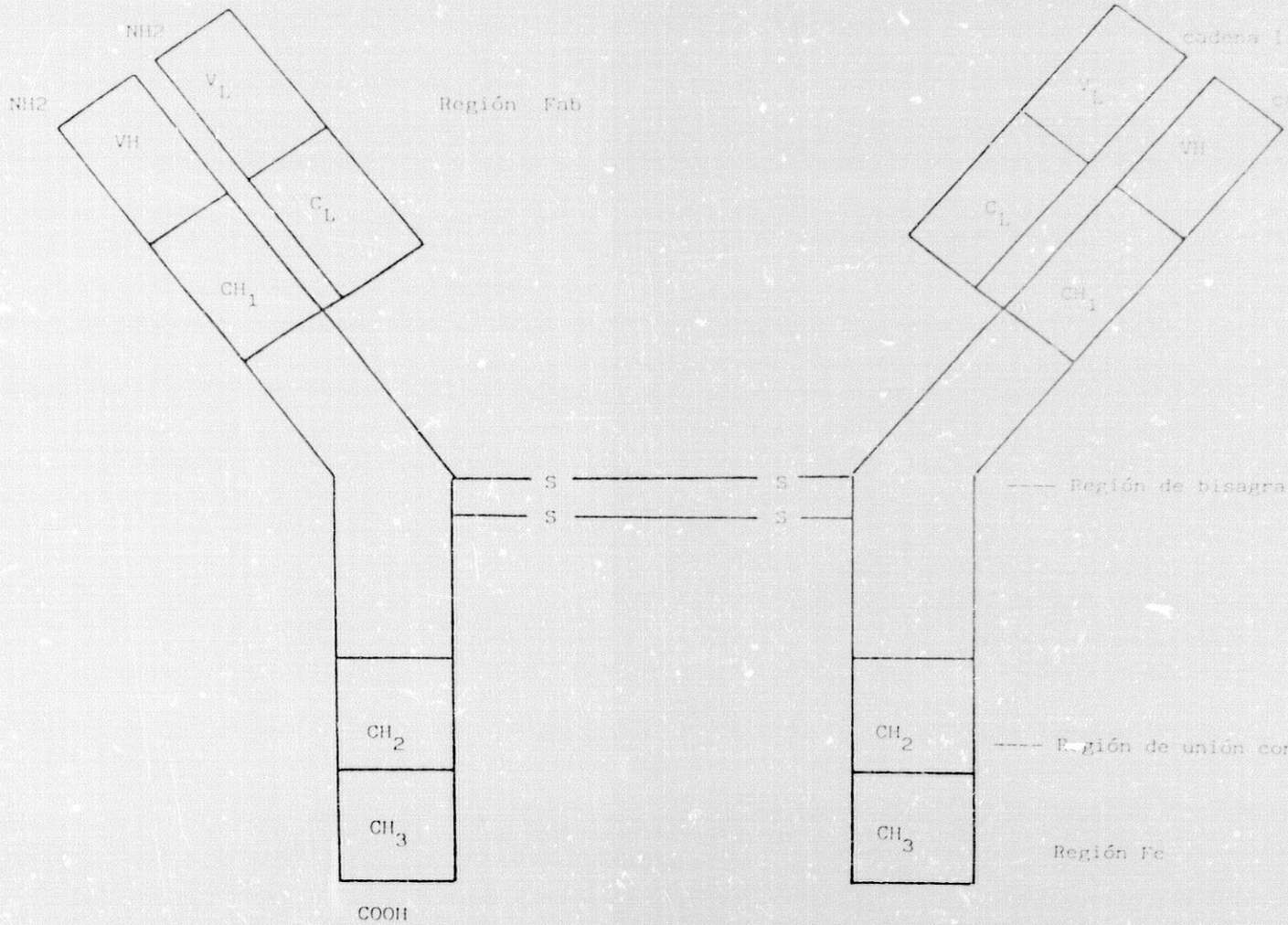
Las flechas pequeñas indican la dirección de la maduración celular. Flechas grandes curvadas indican replicación celular. Y simboliza moléculas de Inmunoglobulinas. M indica cadenas pesadas M en el citoplasma de células pre β. Línea discontinua indica los puntos en los cuales se detiene la maduración en la inmunodeficiencia combinada severa (SCID) agammaglobulinemia ligada a X, e inmunodeficiencia variable común (CVI)

tores de anticuerpos. El primero es una cascada de reordenamiento de los genes de la región variable de los anticuerpos que se codifican para su especificidad como anticuerpo y el segundo es la proliferación clonal. Los antigenos no toman parte en este proceso puesto que las células pre B carecen de anticuerpos de superficie.

2.3.2.- Reordenamiento de los genes de inmunoglobulinas y su expresión.

Las moléculas de anticuerpos secretadas por las células plasmáticas están formadas por cuatro cadenas (dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas) y pueden romperse enzimaticamente en dos fragmentos: Fab y Fc (Fig.VII). Las cuatro cadenas están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Cada cadena está constituida por una región variable (V) y regiones constantes (C) también llamadas dominios. Las cadenas ligeras tienen una región variable (V_L) y una constante (C_L). Las cadenas pesadas tienen una región variable (V_H) y 3-4 regiones constantes (C_H). Las porciones variables constituyen la región Fab que fija el antígeno y contiene las cadenas ligeras y sus marcadores antigénicos (Kappa y Lambda). El fragmento Fc (F de fragmento y C de cristalizable, ya que cristaliza fácilmente después de la digestión enzimática) contiene los marcadores que distinguen las distintas clases de inmunoglobulinas (G, A, D, E, M) y los lugares por los

FIGURA VII .- Estructura de una molécula de Inmunoglobulina G



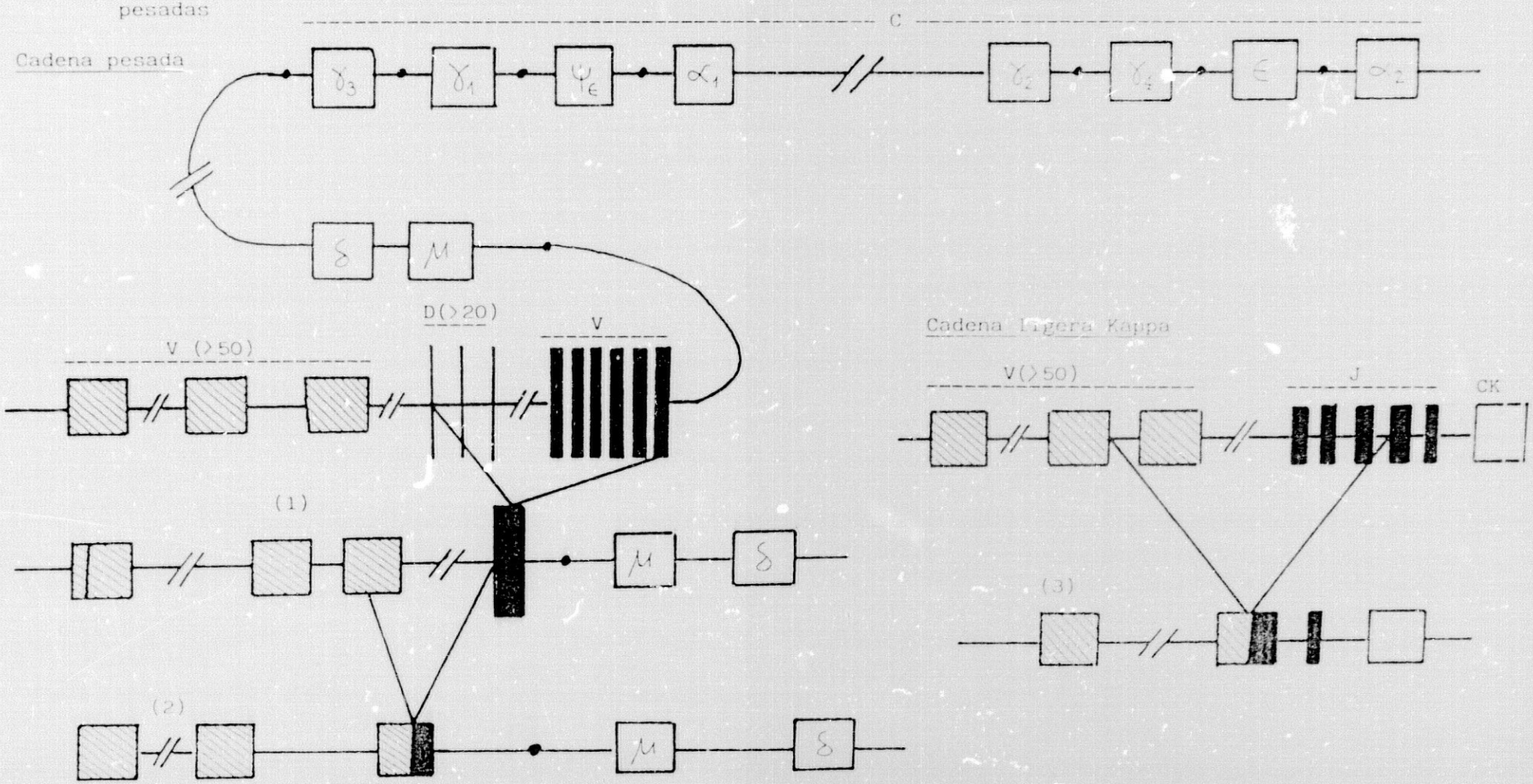
que se fijará el complemento y se unirá a los receptores Fc de las células. La secuencia de aminoácidos de la porción constante (C) es la misma para cada tipo de anticuerpos, pero la secuencia de aminoácidos de la porción variable, como su nombre indica, es muy diversa. Es la zona por donde se une el antígeno y la que confiere la especificidad antigéna.

Las familias de genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas están localizadas en cromosomas separados (los genes de la cadena pesada en el cromosoma 14, los genes de la cadena ligera Kappa en el cromosoma 2 y los genes de la cadena ligera lamba en el cromosoma 22). Cada familia de genes consta de múltiples secuencias codificadas (exones) separadas por unos pilares interpuestos de secuencias no codificadas (intrones) de DNA(Fig. VIII).

Los múltiples exones que se codifican juntos para la región variable deben ser reordenados en las células pre B antes de que comience la transcripción de una cadena ligera o pesada. La cascada de reordenamiento comienza con los genes de la región variable de la cadena pesada.[190]

Inicialmente, uno de los 20 o más genes diversos (D) es transpuesto cerca de uno de los genes de unión (J_H) y el DNA entre los dos genes transpuestos es cancelado. El proceso de translocación DJ_H ocurre en ambos cromosomas. A continuación, uno de los 50 o mas

FIGURA VIII.- Ordenación secuencial de los genes que codifican las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas



genes de las regiones variables (V_H) en uno de los cromosomas es translocado para formar un gen complejo VDJ_H que codifica la región variable completa de la cadena pesada. La ordenación secuencial de V_H ocurre en los dos cromosomas solo cuando se produce una reordenación VDJ_H no productiva en un primer intento. Esto es un mecanismo de control que asegura que una célula individual no puede fabricar dos cadenas pesadas con diferente especificidad antigénica. La ordenación VDJ_H ocurre en la célula grande que se está dividiendo y la expresión de cadenas μ marca la finalización exitosa de la fase de células pre B.

El siguiente paso en la cascada de reordenación de genes tiene lugar en las pequeñas células pre B postmitóticas. Afecta al reordenamiento del gen V => J en la familia de genes de la cadena ligera kappa. Las reglas para la ordenación y expresión de los genes de la cadena ligera son los mismos que para los de la cadena pesada. Cuando ocurre la ordenación V => J en el locus Kappa en el cromosoma 2 y se une VJ_K, el RNA transcriptor puede ser procesado por el RNA mensajero para formar cadenas ligeras. La terminación de este proceso conduce a la formación de cadenas ligeras en las vesículas del retículo endoplásmico. La unión posterior de la cadena ligera con la cadena pesada μ, va a dar lugar a la cadena completa IgM que es transportada por el aparato de Golgi a la superficie celular.

La célula pre B se ha transformado ya en un linfocito maduro capaz de expresar en su superficie IgM.

Por este camino se generan diariamente gran número de células B en la médula ósea (mas o menos 10^9). [133]

Con todas las posibles combinaciones V, D, y J_H y V_y J_L se generan aproximadamente 1 millón de clones de células B vírgenes, cada una de ellas con una especificidad antigénica diferente. Tan rapidamente como son formadas entran en la circulación y emigran a áreas especiales de residencia en el bazo y otros órganos y tejidos linfoides.

Los linfocitos B, en cualquier clón dado, pueden cambiar la producción de inmunoglobulinas desde IgM a anticuerpos de diferentes clases de cadena pesada (isotipos) pero siempre con la misma especificidad antigénica. Así pueden producir IgM e IgD.

De acuerdo con esta teoría clonal, las células B existen en el individuo con receptores de inmunoglobulina específicos para el antigeno antes de que tenga lugar la exposición a este. Cuando se expone al antígeno, este selecciona la célula B poseedora del receptor de superficie IgG complementario y después de la fijación e interacción con células T reguladoras tiene lugar una serie de cambios que describimos a continuación.

2.3.3.- Activación y diferenciación de los linfocitos B:

La generación de millones de clones de células B, su maduración al estadio IgM^+ e IgD^+ y su emigración desde la médula ósea a los órganos linfáticos son todos acontecimientos antígeno-independientes. En ausencia de estimulación por antigénos o mitógenos, la vida para el linfocito B aparentemente termina después de este proceso y la mayoría de las células B que alcanzan los tejidos linfáticos mueren a los pocos días. Los linfocitos B que encuentran antígenos complementarios a su inmunoglobulina de superficie y que reciben ayuda de las células T sufren una serie de cambios que culminan en su supervivencia como células con memoria o su diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos.[117] Los antígenos u otros mitógenos que se unen a las inmunoglobulinas de superficie pueden inducir a la célula B en reposo a entrar en el ciclo celular, a agrandarse y comenzar la síntesis de DNA en preparación para su división. Las moléculas de antígeno que se unen a los receptores de inmunoglobulinas de superficie son introducidas dentro y parcialmente digeridas. Los fragmentos de antígeno posteriormente son reciclados a la superficie de la célula B y expresados en asociación con las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Esta combinación de fragmentos de antígenos y molécu-

las de la clase II de MHC pueden ser reconocidas por las células T por medio de sus receptores de antígeno. En este sentido, las células B (igual que los macrófagos y otras células clase II positivas) pueden presentar antígenos a los linfocitos T helper y estimularlos para la producción de sustancias que promueven la proliferación y diferenciación de la célula B que presenta el antígeno.[175]

Las células B son inducidas entonces a dividirse y sufrir una diferenciación terminal hacia células plasmáticas que producen miles de moléculas de anticuerpos antes de su muerte un día o poco mas tarde. Alternativamente, la célula B activada puede dividirse un número limitado de veces antes de que su progenie de células B entre en el pool de células con memoria.

2.3.4.- Otros receptores de células B

Además de sus anticuerpos de superficie, las células B expresan otros receptores de superficie que usan para recibir señales ambientales que gobiernan sus complejas respuestas. Las células B maduras expresan receptores para fragmentos del complemento (C_3D y C_3B), anticuerpos IgG, interferón y un factor estimulante de células B (también llamado BSF-1 o interleukina 4) que es producido por las células T activadas.[91]

Después de su activación, los linfocitos B expre-

san receptores adicionales que pueden modular su crecimiento y diferenciación (receptores para IgM, IgE, transferrina, interleukina-2 y BSF-2).

Algunos de los receptores de superficie glicoproteicos pueden unirse a más de una sustancia. Por ejemplo, el receptor de superficie para el C_3d también tiene un punto de unión para el virus de Epstein-Barr.

2.4.- MONOCITOS Y MACROFAGOS:

Los macrofagos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune,[84] encargándose de presentar el antígeno a los linfocitos durante el desarrollo de la inmunidad celular y actuando como células accesorias a los linfocitos, al menos parcialmente, para la liberación de sustancias solubles. Los macrófagos tambien desarrollan una labor protectora fundamental, al encargarse de la destrucción y muerte de organismos invasores y como ha sido recientemente descubierto, liberan un enorme número de sustancias implicadas en la defensa del huesped y en la inflamación.[69]

2.4.1.- Aspectos generales y del desarrollo:

Los macrófagos y sus precursores en la misma línea célular, distribuidos por todo el cuerpo, constituyen un sistema fisiológico. Las células en este "sistema mononuclear fagocítico" incluyen los promonocitos y sus precursores en la médula ósea, los monocitos en la circulación y los macrófagos en los tejidos.[71] Estas células constituyen un sistema por su origen común, su morfología similar y sus funciones comunes, incluyendo fagocitosis rápida mediada por receptores para IgG y fragmentos del tercer componente del complemento C_3.

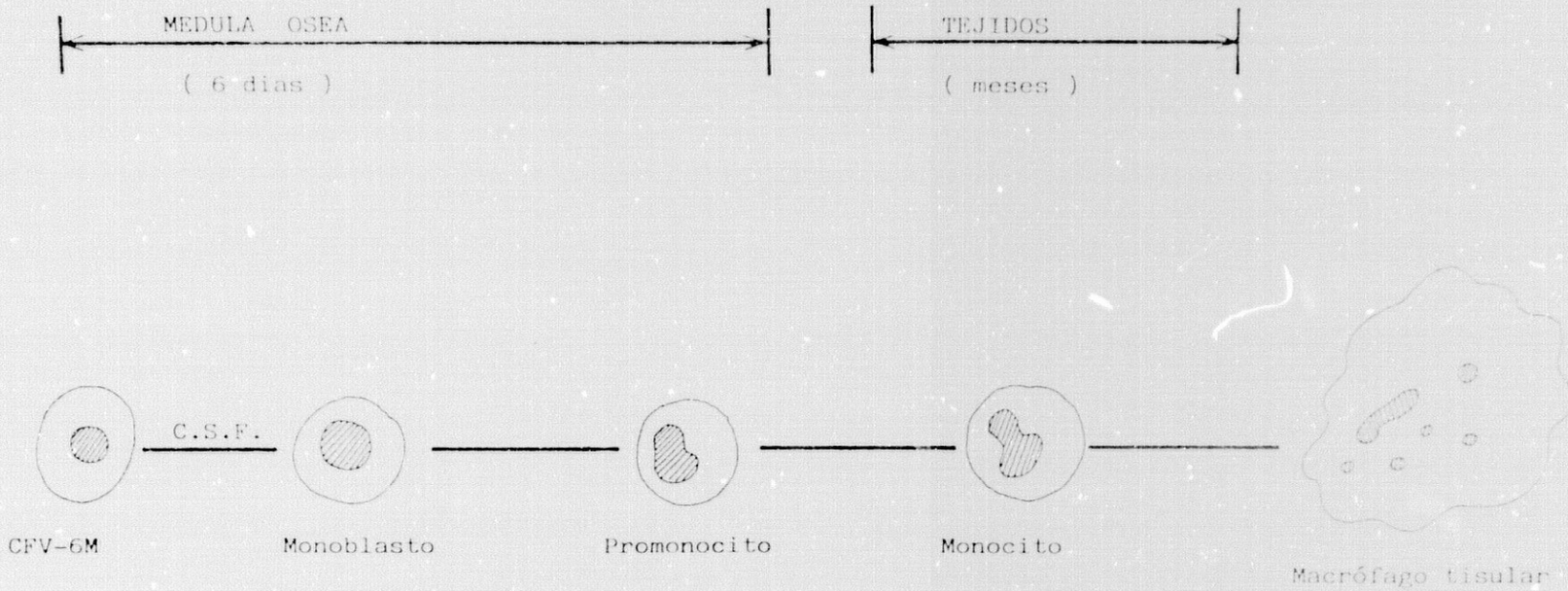
El término sistema mononuclear fagocítico debe reemplazar el término sistema reticuloendotelial totalmente inadecuado a la luz de los conocimientos ac-

tuales.

En la Figura IX se muestra una representación esquemática del desarrollo del sistema mononuclear fagocítico. La línea celular se origina en la médula ósea de un progenitor común para las series granulocito y monocito-macrófago, llamada unidad formadora de colonias granulocito-monocito (CFV-GM).[71] Una hormona glicoprotéica llamada factor estimulante de colonias[165] induce la diferenciación de estas células a monoblastos los cuales se diferencian a promonocitos, la primera célula identificable morfologicamente de la serie. El tiempo de transición en la médula ósea desde el primer precursor monocítico a monocito maduro está alrededor de los seis días.[71] Los monocitos recientemente formados pueden permanecer en la médula ósea algo mas de un día, pero no hay una reserva medular comparable a la de los granulocitos. Los monocitos humanos circulando en sangre periférica tienen una vida media de aproximadamente tres días.

Los monocitos en la circulación son muy heterogéneos tanto en densidad celular como en tamaño, morfología y antígenos de superficie y se han propuesto varios subtipos de monocitos pero no hay datos concluyentes que muestren que los monocitos van predestinados a un sitio en particular cuando abandonan la médula ósea.[84] La emigración de los monocitos a los distintos tejidos parece ser un fenómeno al azar en

FIGURA IX .- Desarrrollo celular en el Sistema Mononuclear Fagocítico



ausencia de inflamación. Una vez que están en los tejidos, los monocitos probablemente no vuelvan a entrar en la circulación. Mas bien sufren una transformación hacia macrófagos tisulares con propiedades morfológicas y a veces funcionales que son características del tejido en que residen. Tal transformación presumiblemente ocurre como respuesta a un estímulo específico tisular. En pacientes que han recibido trasplantes de médula ósea se han encontrado macrófagos alveolares y células de Kuppfer con cariotipo del donante.

La vida de los macrófagos en los tejidos parece ser de meses. La estimación se ha hecho en pacientes que han recibido trasplantes de médula ósea. Los macrófagos del receptor desaparecen progresivamente y son sustituidos progresivamente por macrófagos del donante en un plazo de tres meses después del transplante.[171]

El estadio final del desarrollo de la línea mononuclear fagocito es la célula gigante multinucleada que caracteriza enfermedades inflamatorias granulomatosas tales como la tuberculosis. Tanto los monocitos como los macrofagos aparecen en las lesiones de estas enfermedades antes que las células gigantes y se piensa que sean precursores de las células multinucleadas. De hecho, los monocitos en cultivo durante tres a diez días desarrollan rasgos de los macrófagos tisulares y algunos de ellos se fusionan en células

multinucleadas grandes.[159] Un factor soluble liberado de los linfocitos T activados (quizás interferon gamma) ha demostrado promover la formación de células gigantes cuando se añade a cultivos de macrófagos.

2.4.2.- Activación de los macrófagos:

El paso mas importante en la maduración de los macrófagos desde el punto de vista funcional es la conversión, impulsadas por linfokinas, desde macrófagos en reposo a "macrófagos activados". El concepto de macrófagos activados fue desarrollado en los años 60 sobre la base del trabajo de Mackaness,[112] quien notó que los macrófagos de animales que habían adquirido resistencia a la infección por un parásito facultativo intracelular tenían también actividad microbicida aumentada frente a una variedad de microorganismos. Estudios posteriores han demostrado una serie de diferencias morfológicas, funcionales y metabólicas entre estas células y la células inactivas. Los macrófagos activados son mas grandes, muestran un aspecto rizado de su membrana citoplásmica, una mayor capacidad para la adherencia, formación aumentada de pseudópodos, un número aumentado de vesículas pinocíticas, así como diferencias funcionales que veremos mas adelante. Usado en el sentido mas ampliamente aceptado, la palabra "activación" indica que la célula tiene una capacidad aumentada para destruir microorganismos o células tumorales.

La activación de los macrófagos se produce durante la infección por medio de linfokinas activadoras de los macrófagos liberadas por linfocitos T especificamente sensibilizados a los antígenos del organismo infectante.[128] Esta interacción constituye la base de la inmunidad mediada por células.

El interferón-Gamma parece ser una linfokina especialmente importante en la activación de los macrófagos.[128] El factor estimulante de colonias granulocito-macrófago es una segunda linfokina con tal actividad.

Los macrófagos expuestos a endotoxinas liberan una hormona, el factor de necrosis tumoral-alfa o cachectina, que puede activar por sí misma a los macrófagos bajo ciertas condiciones. Esto hace pensar en la interesante posibilidad de que los macrófagos expuestos a endotoxinas puedan ser autoactivados. Esto les permitiría alcanzar una función incrementada mas rápidamente que lo podrían hacer a través de la clásica inmunidad mediada por células que requiere la acumulación de una población sensibilizada de linfocitos T.

2.4.3.- Actividades funcionales de los macrófagos:

Las principales funciones de los fagocitos mononucleares en la defensa del huésped y los cambios que tienen lugar en estas funciones cuando se activa el monicito se resumen en el cuadro III.

Una de las actividades principales de los macró-

CUADRO III.- Principales funciones de los fagocitos mononucleares y su modificación por el proceso de activación.

Actividad microbicida (>)

Actividad tumoricida (>)

Quimotaxis (>)

Fagocitosis (depende de las particulas)

Pinocitosis (>)

Transporte y metabolismo de la glucosa (>)

Presentación del antigeno >

Secrección

- Lisozima (N.C.)
- Prostaglandinas, leucotrienos (<)
- Apolipoproteina E y lipoproteinlipasa (<)
- Elastasa (<)
- Componentes del complemento (> o NC)
- Hidrolasas ácidas (>)
- Colagenasa (>)
- Activador del plasminógeno (>)
- Proteinasa citolítica (>)
- Arginasa (>)
- Fibronectina (>)
- Interleukina-I (>)
- Factor de necrosis tumoral (cachectina) (>)
- Interferón alfa y beta (>)
- Factor de angiogénesis (>)

(>) significa aumentado (<) significa disminuido

N.C. no cambia.

fagos es la ingestión y muerte de parásitos intracelulares como Mycobacterium tuberculosis, listeria, lehismania, toxoplasma y algunos hongos, pero también eliminan del torrente circulatorio algunos patógenos como neumococos.

La actividad de los macrófagos frente al cáncer es peor conocida. Son capaces de suprimir el crecimiento de algunos tumores; este proceso no implica unicamente una actividad fagocítica, sino que pueden matar células tumorales por medio de productos segregados incluyendo enzimas lisosómicas, metobolitos del oxígeno tales como peróxido, proteínas citolíticas y factor de necrosis tumoral (cachectina).[18,125] Las enzimas proteolíticas presentes en la superficie de los monocitos pueden jugar un papel importante en el rechazo tumoral.

Fundamental para la función protectora de los monocitos es su capacidad para realizar diapedesis a través de la pared endotelial de los vasos y emigrar hacia los lugares de invasión microbiana en los tejidos. Los factores quimiotácticos para los monocitos incluyen productos del complemento y quimioatrayentes derivados de los neutrófilos, linfocitos o células cancerosas.

Los macrófagos activados emigran mas vigorosamente en respuesta a los factores quimiotácticos y pueden entrar en lugares de inflamación (infecciones o

cancer) mas eficientemente que los macrófagos en reposos.

Una vez allí puede producirse la fagocitosis de la célula o del organismo invasor probablemente influenciada por la presencia de opsoninas (anticuerpos, complemento y quizas fibronectina) o por propiedades de superficie inherentes al microorganismo o tumor mas que por la propia activación del macrófago. Esta conclusión esta basada en la observación de que los macrófagos activados tienen una capacidad incrementada para fagocitar algunas particulas (incluyendo eritrocitos opsonizados con C_3b o IgG y bacilos tuberculosos muertos), que otras (incluyendo cándidas y algunas bacterias).

Otra función fagocítica importante de los macrófagos es su capacidad para captar células lesionadas o muertas. Especialmente los macrófagos que se disponen en los sinusoides esplénicos son particularmente importantes en la ingestión de eritrocitos viejos. Los macrófagos tambien están implicados en remover los detritus tisulares y en reparar heridas. Son también importantes en eliminar partículas inorgánicas que entran en los alveolos pulmonares (polvos, productos derivados del tabaco).

La capacidad de introducir dentro de ellos particulas solubles (pinocitosis) y otras actividades metabólicas, especialmente el metabolismo de la gluco-

sa, están incrementadas en los macrófagos activados. Esta actividad acentuada indudablemente potencia la acción microbicida y tumoricida de los macrófagos activados.

Hay multitud de datos publicados que indican que los macrófagos son importantes en la respuesta inmune.[155,175]

Los macrófagos esta encargados de procesar los antígenos y presentarlos a los linfocitos bioquimicamente modificados y por tanto mas reactivos y para servir como células accesorias en la replicación de los linfocitos. Otros tipos celulares pueden servir también para estas funciones bajo ciertas circunstancias. Hay evidencias de que la presentación del antígeno está incrementada en los macrófagos activados, como la observación de que la activación de los macrófagos se asocia con un incremento en el porcentaje de células positivas par el antígeno Ia. El material procesado por los macrófagos se presenta a los linfocitos en unión con el antígeno de histocompatibilidad clase II. La expresión incrementada de antígeno Ia debe preceder a este paso en la inmunoregulación, puesto que la presentación de antígenos por los macrófagos varía directamente con la cantidad de antígeno Ia en la superficie de la membrana.[175]

La capacidad aumentada de los macrófagos activados para sintetizar y liberar una amplia variedad de

sustancias hidroliticas y bactericidas es fundamental para incrementar su capacidad destructora. De hecho el macrófago es una importantisima célula secretora y se han identificado mas de cien sustancias secretadas por ellas.[125,127]

Los monocitos sanguíneos y los macrófagos tisulares son el origen principal de una hormona polipeptídica llamada interleukina I que juega un papel importantisimo en la respuesta inflamatoria. La interleukina I estimula la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos y la producción de linfokinas por los linfocitos T. La síntesis incrementada de interleukina I en los macrófagos activados contribuye a una respuesta inflamatoria mas potente.[50]

Las endotoxinas inducen la síntesis de interleukina I. Este efecto se alcanza, al menos en parte, por una estimulación de los macrófagos para liberar el factor de necrosis tumoral (cachectina), quien a su vez estimula la producción de interleukina I por las células endoteliales y los macrófagos. Tanto el factor de necrosis tumoral cachectina como la interleukina I pueden inducir fiebre y síntesis de reactantes de fase aguda que caracterizan la inflamación.

La función del estadío final del desarrollo del mononuclear fagocito, la célula gigante multinucleada, no ha sido aclarada. Se ha observado que pueden tener capacidad fagocítica tanto in vivo como in vitro y

pueden fagocitar ertrocitos previamente opsonizados y destruir candidas tan efectivamente como los macrógagos. La producción de anión superóxido, así como la expresión del antígeno Ia y el contenido de ciertas enzimas hidrolíticas es comparable a la de los macrófagos.

Desgraciadamente las células gigantes multinucleadas, igual que los macrófagos, pueden servir como reservorio en el cerebro para el virus causante del SIDA y por tanto pueden jugar algun papel en la demencia asociada al SIDA.

En resumen, las células del sistema mononuclear fagocítico, desarrollan tres tipos de funciones:

A) Funciones secretoras.

B) Función fagocítica.

C) Función inmunoreguladora y de presentación de antígeno.

2.5.- **LINFOQUINAS**:

Las linfokinas son productos polipeptídicos que participan en una gran variedad de respuestas celulares incluyendo la regulación del sistema inmune. Son liberadas en respuesta al antígeno, pero en contraste con la composición química de los anticuerpos su composición no está determinada por la del antígeno estimulante. Se pensó inicialmente que las lifokinas se producian exclusivamente por los linfocitos y para comunicarlos con otras células del organismo. Actualmente se sabe que ni su producción ni sus efectos esta restringidos al sistema linfoide. Por este motivo, el termino linfokina deberia ser cambiado por el término más general de citoquinas.

Las linfokinas se producen en todo el organismo. En áreas localizadas como las articulaciones o tejidos linfoides pueden actuar sobre otro tipo de células en la vecindad inmediata (efecto paracrino) o sobre la misma célula que la produce (efecto autocrino). Las linfokinas que se producen en gran cantidad y acceden al torrente circulatorio actúan como una hormona y tienen profundos efectos sistémicos. Aunque no se ha establecido un papel causal de las linfokinas en ninguna enfermedad, su producción en exceso o en defecto puede colaborar con ciertas enfermedades, especialmente de origen infeccioso o autoinmune.

Algunas linfokinas han recibido el nombre de a-

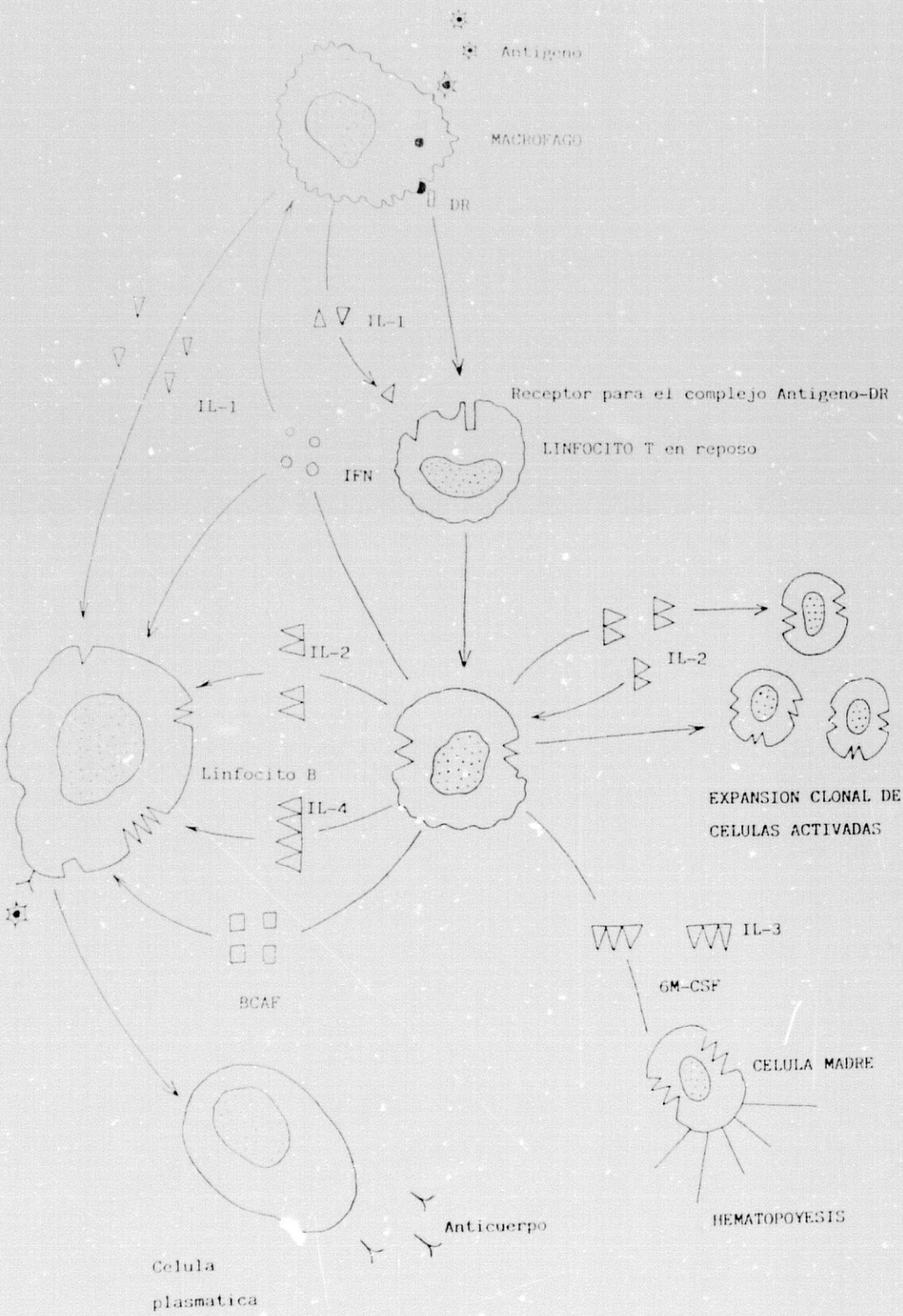
cuerdo con su efecto biológico. Por ejemplo, el factor de difereciación de células B produce activación de las células B para diferenciarse en células productoras de anticuerpos y el factor de crecimiento de células T estimula a las células T a proliferar. Sin embargo, como algunas linfokinas tienen mas de una propiedad biológica, los nombres descriptivos pueden prestarse a confusión. Por ello se ha desarrollado una nomenclatura que utiliza el término "interleukina" seguido de un número. En el Sexto Congreso Internacional de Inmunología en 1.986 se acordó que cada nueva leukina puede ser llamada de acuerdo con su propiedad biológica, pero que una vez que se establece su secuencia de aminoácidos, se le debe asignar un número.[52] Sin embargo, algunas leukinas mantiene su nombre original (por ejemplo, interferón, factor estimulante de colonias, etc.).

2.5.1.- Papel de las linfokinas durante la respuesta inmune:

Las células T reconocen a los antígenos solo después de que estén expuestos en la superficie de los macrófagos (u otras células presentadoras de antígenos) en asociación física con la molécula clase II del antígeno de histocopatibilidad (DR). El receptor de antígeno de la superficie de las células T que interactua con el complejo antígeno-DR consta de 5 péptidos, 3 de los cuales son invariables de célula a célu-

la y dos que son únicos para cada clón celular. Estos dos péptidos últimos son los que dan la especificidad antigénica a cada clón celular y el complejo de tres proteínas invariables se llama CD_3. Cuando el antígeno se presenta en la configuración adecuada al receptor antigénico complementario, la célula T se hace activa. Como consecuencia de su activación el linfocito sintetiza una variedad de proteinas, de las cuales unas son secretadas y otras se convierten en componentes integrales de la membrana celular. Las interleukinas 1, 2, 3 y 4, el factor diferenciador de células B y el interferón gamma son secretados. Aunque los antígenos estimulan solo a ciertos linfocitos B y T por interacción con su inmunoglobulina de superficie y receptor antigénico respectivamente, las linfokinas producidas en respuesta a su activación son independientes de la especificidad antigénica que inició la respuesta inmune así como del antígeno de histocompatibilidad en los macrófagos. Las linfokinas actuan para amplificar las respuestas al antígeno de una manera no específica. Como se muestra en la Figura X, el interferón gamma liberado de las células T activadas incrementa la expresión DR en los macrófagos, incrementando por tanto la respuesta de las células T al antígeno. La interleukina I aumenta la síntesis de interleukinas 2, 3 y 4, gamma interferón y receptores para interleukina 2 .La interleukina 2 se une a los receptores especí-

FIGURA X.- Papel de diferentes linfokinas en la producción de anticuerpos.



ficos en las células T activadas dando lugar a la expansión del clón activado. La interleukina 4 y el factor de crecimiento de las células B proporcionan la señal para el crecimiento de las células B que han recibido antígeno.

2.5.2.- Interleukina 2

La interleukina 2 es una proteína con peso molicular de 15.000 que tiene varias funciones inmunológicas, la mas importante de las cuales es iniciar la proliferación de las células T activadas.[123] Los receptores de alta afinidad para la interleukina 2 están ausentes en las células T en reposo pero aparecen a las horas de su activación. La unión de la interleukina 2 a estos receptores de lugar a la expansión clonal de las células T activadas por el antígeno y conduce a la involución de los receptores de interleukina 2 y al cese de la proliferación de células T incluso en presencia de interleukina 2, limitando por tanto la expansión de la proliferación clonal de las células T. La interleukina 2 ha sido empleada en el laboratorio para el crecimiento de la célula T con funciones específicas facilitadoras, supresoras y citotóxicas. Ha sido también empleada para cultivar células T malignas de pacientes con leucemia de células T y células T infectadas con retrovirus linfotrópicos. Se sabe que el timo contiene una población de timocíos inmaduros que tienen receptores para interleukina 2, sugiriendo

que esta linfokina puede jugar algún papel en la maduración de las células T.[145] La interleukina 2 incrementa marcadamente la actividad citolítica de una población de células asesinas naturales (NK) capaces de destruir células tumorales independientemente del antígeno de histocopatibilidad.[70] Esta propiedad ha llevado a usarla en ensayos clínicos en pacientes con cáncer. La interleukina 2 es necesaria par la expansión clonal de células T citotóxicas.

2.5.3.- Linfokinas implicadas en la activación de las células B y producción de anticuerpos

Las células B son activadas en una cascada de pasos que comienzan con una célula B pequeña en reposo y termina en una célula plasmatica encargada de producir un determinado tipo de anticuerpo. Los tres principales pasos que conducen a la producción de anticuerpos son: 1.- Activación específica de la célula B con memoria. 2.- Proliferación (activación clonal). 3.- Diferenciación hacia células productoras de anticuerpos. Una pequeña célula B en reposo se convierte en una célula B grande y proliferativa cuando la inmunoglobina de superficie de la célula se une a su antígeno. Este es el primer paso en la activación. Para progresar al segundo paso, la célula B activada requiere el concurso de la linfokina llamada factor de crecimiento de células B o factor estimulante de células B. El factor estimulante de células B se llama

actualmente interleukina 4.[191] Hay otro factor de crecimento del células B que no tiene relación estructural con el anterior.[162] Una vez que la célula B ha comenzado a proliferar otra linfokina llamada factor diferenciador de células B (también conocido como factor 2 estimulante de células B) dirige la proliferación de células B para convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. El factor diferenciador de las células B ha sido clonado y su secuencia de aminoácidos es idéntica a la del interferón $beta_2$. La interleukina 1, que también interviene en la activación de células B, estimula la producción del factor 2 estimulante de células B.[177] Este interferón $beta_2$/factor 2 estimulante de células B es también idéntico a otra citokina llamada factor estimulante de los hepatocitos, que estimula la síntesis de algunas proteínas hepáticas de fase aguda.

Las linfokinas que participan en diferentes estadios de la maduración de las células B también toman parte en determinar qué tipo de anticuerpo es secretado por las células plasmáticas. La interleukina 1, interleukina 2 o alfa o gamma interferón incrementan la acción de las linfokinas estimulantes de células B.

2.5.4.- Interferón

El interferón fué identificado inicialmente por su capacidad para "interferir" con la reduplicación viral en las células infectadas.El alfa-interferón

(originalmente llamado interferón leucocitario) y beta interferón (originalmente llamado interferón de los fibroblastos) son polipéptidos estructuralmente relacionados, inducidos por infección viral y poseen potentes propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunológicas. El alfa interferón incrementa las moléculas clase I en los linfocitos y puede modular la producción de anticuerpos pero como consecuencia de su efecto antiproliferativo puede ser inmunosupresor. Una propiedad importante del alfa interferón es su capacidad para incrementar la actividad de las células "natural Killer".

Estructuralmente distinto del alfa y beta interferón está el gamma interferón, que tiene diversos efectos en la respuesta inmune pero que también afecta a varios tejidos no linfoides. Induce las moléculas de histocompatibilidad clase I y II y es un potente activador de la función de los macrófagos. Además interactua con otras linfokinas, bien sea de manera agonista o antagonista.El gamma interferón aumenta las linfokinas estimulantes de células B e incrementa la producción de anticuerpos pero antagoniza los efectos del la inteleukina I en el tejido conectivo inhibiendo las síntesis de colágeno.[154]

2.5.5.- Linfokinas que afectan a la hematopoyesis.

La producción de células hemáticas maduras está regulada por un contacto entre el estroma celular de

soporte en la médula ósea y la célula madre pluripotencial. Esta célula madre está también influenciada por las linfokinas.

Las linfokinas que afectan a la hematopoyesis son llamadas habitualmente "factor estimulante de colonias". Dos factores estimulantes de colonias han sido perfectamente identificados: el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago y la interleukina 3.[32] Aunque estas sustancias probablemente no tomen parte en la hematopoyesis basal, es posible que sean las responsables de la hiperplasia eritroide y leucocitosis periférica. La interleukina 3 es producida por las células T activadas y es capaz de apoyar a colonias de múltiples líneas (esto es, colonias medulares) de una única célula madre pero que contiene eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos en varios estadíos de diferenciación. Aunque el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago también apoya colonias de múltiples líneas, ejerce su acción principal mas tardiamente en la secuencia de maduración apoyando los factores de crecimiento y diferenciación de células obligando a convertirse en granulocitos y macrófagos. Además el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago incrementa la capacidad bactericida de los granulocitos, la producción de superóxido, el número de receptores para quimioatrayentes, la ingestión de bacterias y la destrucción de células tumorales

cubiertas por anticuerpos. Algunas linfokinas tales como el gamma interferón y el factor de necrosis tumoral antagonizan al factor estimulante de colonias y pueden inducir anemia aplástica.

2.5.6.- Interleukina I y factor de necrosis tumoral

Hay dos interleukinas I estructuralmente relacionadas (alfa y beta) producidas por casi todos los tipos celulares incluyendo linfocitos B y T, "natural Killer", keratinocitos de la piel, astrocitos cerebrales, microglia, células epiteliales, células mesangiales y tejidos vasculares.[51] La producción de interleukina I se induce por antígenos, toxinas, traumas y procesos inflamatorios. La interleukina I actua sirviendo como cofactor durante la activación de los linfocitos, principalmente induciendo la producción de otras linfokinas y la activación de las células T en reposo. Otra propiedad que se ha descubierto de la interleukina I es su capacidad para actuar como cofactor con el factor estimulante de colonias en la promoción de los precursores de la médula osea despues de la supresión por drogas citotóxicas.

Los efectos sistémicos de la interleukina I están asociados con respuestas de fase aguda. A las pocas horas de una infección o trauma la interleukina I puede detectarse en la circulación.[49] Induce fiebre, sueño, síntesis de proteínas hepáticas de fase aguda y liberación de neutrófilos, ACTH, cortisol e insulina.

Tiene un efecto dramático sobre las células endoteliales produciendo un estado procoagulante, adherencia leucocitaria, liberación de prostaglandinas e hipotensión. Está presente en el líquido articular inflamatorio y se piensa que puede jugar un papel importante en la patogenia de la artritis reumatoide induciendo proteasas y reabsorción ósea. Es también citotóxica para algunos tumores y las células beta de los islotes pancreáticos productoras de insulina.

La interleukina I comparte muchas de sus múltiples propiedades sistemicas con otra molécula, el factor de necrosis tumoral alfa (también llamado cachectina).[17]

En contraste con la interleukina I, el factor de necrosis tumoral alfa no parece tener ningún efecto en la activación de los linfocitos aunque es producido por células T periféricas activadas por antígeno. A pesar de tener una secuencia de aminoácidos distinta y receptores independientes, ambas sustancias inducen el mismo espectro de cambio de fase aguda. Ambas actuan sinergicamente en una amplia variedad de respuestas biológicas incluyendo necrosis tumoral, reacción local de Shwartzman, hipotensión y reacciones inflamatorias.

La linfotoxina (también llamada factor de necrosis tumoral beta) es un producto de los linfocitos y es similar al factor de necrosis tumoral alfa en sus efectos. Las linfokinas, particularmente el interfe-

rón, interleukina I y factor de necrosis tumoral pueden acceder a la circulación durante la infección, trauma o reacción antigeno-anticuerpo produciendo una serie de efectos sistémicos incluyendo lesión tisular, anormalidades metabólicas y cambios neuroendocrinos. El endotelio vascular, varios órganos endocrinos y el hígado son órganos diana prominentes para estas y otras linfokinas. La observación de que estas sustancias, producidas durante una respuesta inmunológica a antigenos extraños, pueden afectar a tejidos no inmonológicos sugiere que algunas enfermedades inflamatorias y degenerativas pueden tener una base inmunológica.

2.6.- COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los antígenos que existen en cada especie se conocen con el nombre de aloantígenos y son por supuesto diferentes de un individuo a otro. Cuando estos antígenos tienen un papel determinante en el rechazo de transplantes de órganos se conocen con el nombre de antígenos de histocompatibilidad.

Los genes de la histocompatibilidad pueden ser:

a) Mayores: su producto antigénico está situado en la superficie de las células y suponen una fuerte barrera para el transplante.

b) Menores: cuyo producto está situado en cualquier parte del genoma.

El conjunto de antígenos y genes determinantes mayores de histocompatibilidad se le conoce con el nombre de Complejo Mayor de Histocompatibilidad y tiene una extraordinaria importancia en la defensa del huesped y el rechazo de transplantes alogénicos.

Las siglas HLA, aunque tienen un significado distinto, por acuerdo internacional se considera como el logotipo del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad están situados en la región 21 del brazo corto del cromosoma 6. Hay 3 productos génicos distintos en esta región:

1- Moléculas de la clase I. Hay 3 loci perfectamente reconocidos: HLA-A, HLA-B Y HLA-C; sus productos anti-

génicos se conocen con el nombre de antígenos clase I, que están expresados en todas las superficies celulares y de ellas depende el rechazo de transplantes, con especial afinidad por linfocitos T8.

2- Moléculas de la clase II. Situadas en el loci HLA-D. Sus antígenos están expresados en las superficies celulares de los monocitos-macrófagos, linfocitos B y linfocitos T4 y hay 3 grupos DP, DQ Y DR. Es imprescindible que el antígeno sea presentado al linfocito T4 junto con esta molecula clase II para que el linfocito lo reconozca como no propio.

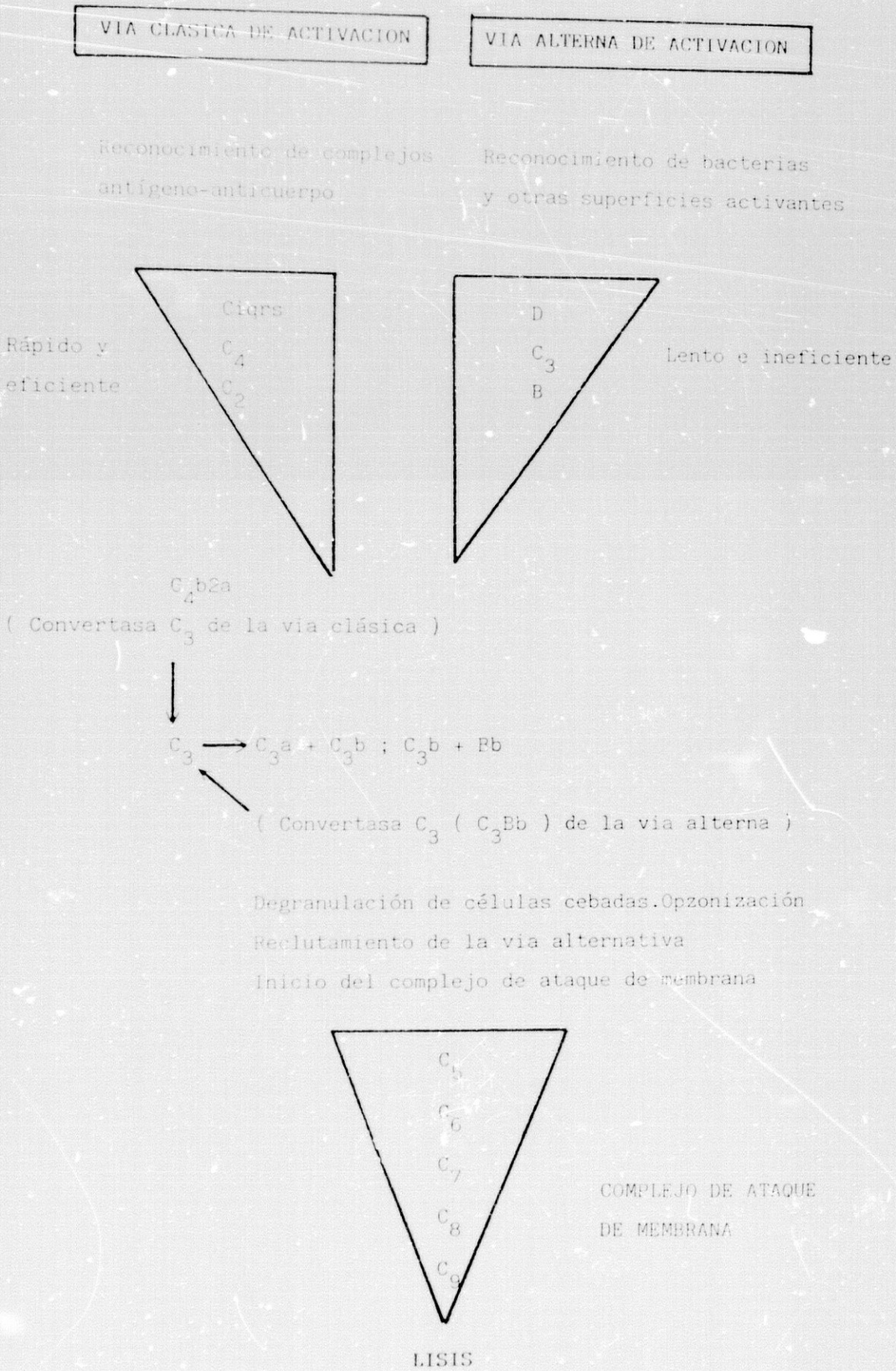
3- Moléculas de la clase III. Su expresión son los componentes C4, C2 y Bb del completo.

2.7.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El sistema del complemento está formado al menos por 20 proteínas diferentes (14 componentes del complemento y sus proteínas reguladoras) que circulan en la sangre en forma de moléculas precursoras inactivas. Se ha comprobado que diversos tipos celulares sintetizan estas proteínas, entre ellas el hepatocito y las células fagocíticas mononucleares parecen ser las más importantes. Una vez establecido contacto con los activadores, las proteínas del complemento se organizan para seguir tres vías de activación: 1) la vía clásica, activada principalmente por complejos de antígeno-anticuerpo IgG e IgM más otros factores como DNA, virus RNA de tumor y proteínas del sistema de coagulación. 2) la vía alterna, activada por polisacáridos estructurales de la pared de las células de bacterias y hongos así como el anticuerpo agregado IgA e IgE. 3) una vía terminal común llamada complejo de ataque de membrana, activada tanto por la vía clásica como por la vía alterna(Figura XI).

La activación de la vía clásica del complemento mediante C1, C4, C2 y la activación de la vía alterna a través del factor D, C3 y factor B conducen a al separación y activación de C3; éste es una proteína cuyos productos son indispensables para la opsoniza-

FIGURA XI .- Componentes del sistema de complemento.



ción (recubrimiento de anticuerpo y complemento como preparación para la fagocitosis) de bacterias y otros antígenos extraños. Un fragmento de proteínas (C3b) se produce por activación de C3 y es necesario para la activación de los componentes finales del complemento. Cuando estos componentes (C5 a C9) se activan, forman una molécula llamada "complejo de ataque de membrana" que se inserta en las membranas celulares y produce la lisis osmótica de las células. C3b se une también con productos de degradación del factor B (llamados Bb) para formar C3Bb, también conocido como convertasa C3 de la vía alterna. La activación de la vía clásica del complemento produce degradación de C4 y C2, con una fusión de los fragmentos resultantes llamado C4b2a y también convertasa C3 de la vía clásica. Ambas convertasas C3 (de la vía clásica y de la vía alterna) funcionan para separar C3 y formar C3b activo, encargado de activar los componentes terminales del complemento y formar el complejo de ataque de membrana. El hecho de que C3b pueda combinarse con Bb para formar la convertasa C3 de la vía alterna origina una poderosa asa de retroalimentación positiva para producir C3b y con ello la activación continua de los componentes terminales del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se hace por interacción de complejos de antígenos y anticuerpos que ligan C1q, una subunidad de C1. Los isótipos de inmunoglobu-

lina que liga C1q y activan la vía clásica son IgM, IgG_1, IgG_2 e IgG_3. A diferencia de ellos, IgA1, IgA2 e IgD activan el complemento por la vía alterna. Además en el suero de algunos sujetos con glomerulonefritis membranosa proliferativa están presentes factores nefríticos (autoanticuerpos IgG contra C3bBb, la convertasa C3 de la vía alterna). La unión de estos factores con C3bBb produce estabilización de la actividad enzimática de C3bBb y facilita la retroalimentación positiva en el asa de ampliación de la vía alterna de C3. La activación de la cascada del complemento por la vía clásica por complejos inmunitarios que contiene IgG o IgM es rápida, eficiente y culmina en activación de los componentes terminales del complemento. A diferencia de ello, la activación de la vía alterna por medio de complejos inmunitarios que contienen IgA o por endotoxinas bacterianas es más lenta y menos eficaz para activar los componentes terminales del complemento. Así pues, la composición del isótipo de inmunoglobulina de los complejos antígeno-anticuerpo es un factor crítico para controlar la activación del complemento y, por tanto, determinar la eficacia de la eliminación de complejos Ag-Ac por células que contienen receptores Fc.

Además de la importancia del complemento en la opsonización y lisis celular, diversos fragmentos de los componentes del complemento son mediadores poten-

tes de activación celular. C3a y C5a se unen a receptores de células cebadas y basófilos y producen liberación de histamina y otros mediadores de anafilaxia. C5 es también un potente quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y macrófagos.

El papel de estos componentes C3a, C5a y C3b en la inmunoregulación de la función de las células T y B y en la inducción de supresión es un camino aún pendiente de desbrozar.

En el cuadro IV se resumen las actividades biológicas de algunos componentes del complemento.

Cuadro IV.- Actividades biológicas de algunos componentes del complemento.

COMPONENTE	ACTIVIDAD
C_4 Cinina C_2	Aumenta la permeabilidad capilar.
C_3a	Anafilotoxina:produce liberación de histamina por basófilos, serotonina por plaquetas.
C_5a	Anafilotoxina: produce liberación de histamina por basófilos, quimioatrayente poderoso para monocitos y neutrófilos.
C_3b	Aumento de fagocitosis por neutrófilos y monocitos. Estimula la unión de complejos inmunitarios a células en el sistema monocito y macrófago, así como neutrófilos. Con Bb forma convertasa C_3 de la vía alterna y amplifica ésta. Promueve solubilidad de complejos inmunitarios.
C_5-Ca	Complejo de ataque a membrana; forma conductos transmembrana que conducen a destrucción celular.

2.8.- UNA VISION INTEGRADA DEL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario normal comprende mecanismos específicos e inespecíficos; ambos son necesarics para proteger contra la infección. Los mecanismos inespecíficos son los destinados a organismos diferentes múltiples sin necesidad de sensibilización o exposición previa. Este sistema puede considerarse como bastante primitivo; incluye las células fagocíticas (neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos y eosinófilos) y los componentes de la cascada del complemento.

Los neutrófilos polimofonucleares(P.M.N.) son la primera línea de defensa contra gérmenes invasores. A pesar de la aparente ausencia de especificidad de estas células, en realidad sus actividades son muy complejas y están coordinadas. En forma sucesiva, los P.M.N. salen de la circulación por influencia de sustancias que estimulan la adherencia necesaria de estos fagocitos al endotelio vascular, después de su marginación dentro de los vasos sanguíneos. Las sustancias que aumentan la adherencia endotelial como algunos componentes del complemento, también pueden dirigir las propiedades quimiotácticas de los P.M.N. que luego veremos.

Después de producida la diapedesis entre células del endotelio, los P.M.N. siguen sus actividades en el espacio extravascular, bajo la influencia de quimioa-

trayentes, los más notables los componentes C3a y C5a del complemento. Bajo la dirección de esta y otras sustancias quimioatrayentes, los P.M.N. se localizan en los lugares donde están los microorganismos. Posteriormente los P.M.N. aprisionan directamente por fagocitosis los microorganismos. A veces este proceso puede estar facilitado por opsoninas (anticuerpos o componentes del complemento) que especificamente se ligan al agente ofensor, lo recubren y aumentan las fagocitosis. Los anticuerpos o componentes del complemento que revisten al agente ofensor se fijan a receptores de superficie de los P.M.N. aumentando así la adherencia y facilitando el aprisionamiento. De todas maneras, muchas partículas pueden ser ingeridas en ausencia de opsoninas.

Pseudópodos derivados de los P.M.N. rodean al invasor incluyéndolo en una vacuola compuesta de membrana del propio neutrófilo. Una vez completada la ingestión, gránulos lisosómicos descargan su contenido, fusionándose con la vacuola para formar un lisosóma. Los gránulos lisosómicos son heterogéneos y se dividen en tipo "primario" (basófilo) y "secundario" (acidófilo). Al tiempo que ocurren estos acontecimientos, se desarrollan cambios intensos en el metabolismo de los P.M.N. en particular afectando al metabolismo oxidativo; así se genera peróxido de hidrógeno y especies reactivas de oxígeno (superóxido, radicales de

hidróxilo).

Además, hay estimulación tanto de la derivación de monofosfato de exosa como de la yodación de proteínas. Así pues, el organismo dispone de mecanismos dependientes e independientes de oxigeno para destruir microorganismos.

Los fagocitos mononucleares existen como monocitos intravasculares libres, móviles y unos macrófagos extravasculares más maduros que se descubren en el peritoneo, pulmón, hígado, bazo y gánglios linfáticos. Cuando los monocitos maduran pasando a ser macrófagos, tienen lugar una serie de acontecimientos, incluyendo un aumento del volumen celular y de su densidad, su actividad metabólica y de las organelas intracelulares. Las células de la serie monocito-macrófago poseen muchas de las capacidades funcionales que hemos mencionado en el caso de los P.M.N. Se produce quimiotaxia, opsonización, fagocitosis y destrucción por mecanismos similares a los P.M.N. en mayor o menor grado. Baste decir que muchos de los mecanismos de actividad fagocítica de los P.M.N. operan en los fagocitos mononucleares; de todas maneras existen diferencias que pueden explicar, en parte, el repertorio diverso de organismos susceptibles de destrucción por P.M.N. o por monocitos-macrófagos.

Los individuos con función defectuosa de las células fagocítica suelen presentarse con abcesos cutá-

neos o viscerales recurrentes, causados por microorganismos como Staphylococcus aureus o Klebsiella y de la especie serratia. Así pues, tales infecciones sugeriran un defecto de la fagocitosis y requeriran un estudio detallado de esta. El sistema del complemento es un cascada compleja de proteinas importante para iniciar la quimiotaxis de la célula fagocítica, estimulando la opsonización y participando en reacciones citotóxicas.

Puede activarse por la via clásica por inmunoglobulinas IgG o IgM (en complejos agregados), DNA, proteina C reactiva y proteina A de los estafilococos o por la vía alterna (properdina) por IgG ó IgA, polisacaridos y algunas enzimas. En el curso de la activación del complemento se generan diverso componentes importantes y biologicamente activos. Por ejemplo, los componentes C_3a, C_4a y C_5a son importantes para aumentar la permeabilidad capilar, iniciar la quimiotaxis de fagocitos y estimular la liberación de aminas vasoactivas y enzimas lisosómicas. Sea por una u otra vía y con mayor o menor eficacia por tanto, se forma el complejo C_5-C_6-C_7-C_8-C_9, llamado también complejo de ataque de membrana, o sea, el componente final de la cascada. El mecanismo, único o múltiple, por el que este complejo provoca lesión de la membrana no lo conocemos bién aunque se supone que incluye un "agujero" en la membrana que permite la producción de cambios

osmóticos dentro de las células y en última instancia su lisis. Se han descrito deficiencias de todos los componentes del complemento; algunas ocasionan lupus eritematoso sistémico (C_1, C_4, C_2, C_5, C_8) infecciones piógenas (C_3, inhibidor de C_3b), infecciones recurrentes por neisseria (C_{5-8}) o angioedema hereditario (inactivador de C_1). En circunstancias adecuadas, estos trastornos han de sugerir la existencia de la correspondiente deficiencia de complemento.

El sistema inmunitario específico es aquel en el cual la respuesta está dirigida contra un antígeno individualmente distinto. Además de la especificidad, este sistema tiene una memoria que le permite recordar una respuesta al tener lugar mas tarde un nueva exposición al agente ofensor. El sistema específico se ha dividido en sistema humoral y sistema mediado por células. El sistema humoral depende de los linfocitos B (derivados de la bolsa de Fabricio), y las células plasmaticas y los productos derivados de éstas, los anticuerpos. Despues de una exposición en circunstancias adecuadas a un antígeno, las células B de la medula ósea, bazo, ganglios linfaticos y sangre periférica responden diferenciandose y proliferando. La formación última de anticuerpos especificos del antígeno esta influida por células de la linea monocito-macrófago y por las células reguladores de la inmunidad, los linfocitos T. Estas células pueden estimular

o suprimir la producción de anticuerpos y tienen importancia crítica para iniciar y suprimir la respuesta humoral. Si se produce (con el permiso de los linfocitos T), la respuesta humoral primaria incluye la producción de anticuerpos IgM específicos del antígeno seguida de la respuesta secundaria, durante la cual se forman anticuerpos IgG. Después de la nueva exposición al mismo antígeno, el tiempo transcurrido hasta producirse la respuesta máxima de IgM e IgG se acorta y la respuesta de anticuerpos es mas intensa y mas sostenida. Pacientes con deficiencias humorales (totales o específicas de clase) suelen presentarse con infecciones recurrentes de vías respiratorias altas y bajas y de oídos por bacterias virulentas como el neumococo o Haemophilus Influenzae. Tambien son frecuentes las parasitaciones por Giardia Lamblia.

La otra rama efectora de la respuesta específica es el sistema inmunitario mediado por células. Los antígenos son elaborados por los macrófagos y presentados a las células T auxiliares. Estas células T tienen receptores específicos de antígeno. Una vez producida la fijación, se producen cambios en la célula T incluyendo síntesis de DNA, RNA, transformación blástica y división celular. Estos procesos se acompañan de secreción de sustancias solubles llamadas linfokinas, cuyas actividades incluyen la intensificación de otros procesos inmunitarios e inflamatorios.

Las células T tienen también capacidad citotóxica mediada por el subgrupo citotóxico/supresor y esta capacidad citotóxica esta especificamente dirigida contra el blanco después de la exposición a células tumorales, células infectadas por virus o linfocitos alógenos (HLA disimiles). El desarrollo de esta actividad citotóxica esta facilitado por las células T auxiliares que producen linfokinas capaces de estimular la actividad citotóxica.

Otras células que intervienen en la respuesta del sistema mediado por células son las asesinas naturales (NK, de natural Killer) que pueden destruir células tumorales infectadas por virus sin sensibilización previa y en ausencia de anticuerpos. Esta actividad es primaria y tiene por objeto la vigilancia contra virus y tumores.

2.9. VALORACION DEL SISTEMA INMUNITARIO

2.9.1. Determinación de inmunoglobulinas séricas.

La demostración de un déficit de una o de varias de las inmunoglobulinas es en la mayoría de los casos todo lo que se necesita para definir un síndrome específico de deficiencia humoral. En la práctica suelen determinarse IgG, IgA e IgM. La determinación de IgD e IgE no es útil cuando se sospecha una inmunodeficiencia humoral.

2.9.2. Determinación de isohemaglutininas.

Algunos pacientes con déficit de la inmunidad humoral pueden tener valores séricos de inmunoglobulinas próximos a la normalidad. En estos casos está justificado la medición de anticuerpos naturales que reciben el nombre de isohemaglutininas. Estos anticuerpos son reactivos con los antígenos A y B de los glóbulos rojos y existen en el suero de todas las personas a excepción de los del grupo sanguíneo AB. Todos los demás individuos tendrán títulos importantes de anticuerpos contra los antígenos que no existen en su glóbulos rojos. A partir de los seis años ya deben observarse títulos superiores a 1/16. Su disminución indica un déficit severo de la inmunidad humoral.

2.9.3. Titulo de anticuerpos frente a difteria, tétanos y tosferina.

En individuos previamente vacunados deben detectarse en sangre periférica anticuerpos frente a estas enfermedades. Como en el caso de las isohemaglutininas su ausencia indica una incapacidad para producir anticuerpos y por tanto un déficit severo de la inmunidad humoral.

2.9.4. Pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía.

Estas pruebas consisten en la administración intradérmica de antígenos y observar la reacción local que producen. Se valora solo la induración. Deben utilizarse varios antígenos y los más usados son candida albicans, toxoide tetánico, parotiditis, estreptocinasa-estreptodornasa y derivado proteico purificado (PPD). Exploran la integridad del sistema inmunitario pero son muy poco específicos y no se usan hoy.

2.9.5. Determinación de poblaciones linfocitarias. [156]

Los linfocitos pueden dividirse en varias subpoblaciones linfocitarias en base a diferentes estructuras de la superficie de las membranas. Los linfocitos B tienen inmunoglobulinas de superficie (SIg), antígenos Ia, dos tipos de receptores para el complemento y más de tres tipos de receptores para la región Fc de IgG, IgM e IgE. Estos receptores de superficie se utilizan para detectar mediante técnicas de inmunofluorescencia a los linfocitos B, que suponen en general

del 5 al 16% del total de los linfocitos.

Los linfocitos T no muestran estos receptores de superficie. En cambio tienen unas características particulares que permiten su determinación:

a) su capacidad para formar rosetas con los hematíes de carnero.

b) en su desarrollo ontogénico van expresando antígenos de superficie que pueden ser determinados mediante anticuerpos monoclonales de la serie OK o de la serie Leu.

Todos los linfocitos T exhiben receptores de superficie para anticuerpos monoclonales OKT3 o Leu 1. Por tanto, este anticuerpo se utiliza para determinar el número total de linfocitos T. Del 63% al 81% de los linfocitos en sangre periférica muestran características de linfocitos T.

Los linfocitos facilitadores tienen en su superficie el antígeno T4 y pueden determinarse mediante anticuerpos monoclonales de la serie OKT4 o Leu3 y representan del 35% al 53% del total.

Los linfocitos citotóxicos supresores expresan en su superficie el antígeno T8 y se determinan con anticuerpos monoclonales de la serie OKT8 o Leu2 y representan del 21% al 36% de los linfocitos totales.

El índice de linfocitos facilitadores/supresores (OKT4/OKT8) suele oscilar entre 1'2 y 2. A este índice se le prestó mucha atención con la aparición del sín-

drome de inmunodeficiencia adquirida donde se presenta un descenso incluso antes de la aparición de la enfermedad. Pero este descenso es inespecífico, hoy se le presta poca atención y de hecho no está incluido en los criterios para el diagnóstico de síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Indicaciones clínicas. Hay varias áreas clínicas en las cuales es útil la información del número de linfocitos que posee un sujeto en cada uno de los diferentes subtipos. La primera es para valorar un número aumentado de linfocitos o unas anormalidades morfológicas que puedan indicar una proliferación maligna y poder asignarla a una estirpe determinada (B o T). Otro área en el que tiene aplicación clínica la cuantificación de las distintas subpoblaciones de linfocitos es el estudio de un paciente en el que se sospecha una inmunodeficiencia, bien primaria o secundaria.

Por último, otro área de aplicación clínica es amplia e incluye una variedad de enfermedades agudas y crónicas en las que hay alguna evidencia de alteración del sistema inmune. En algunas enfermedades tales como la mononucleosis infecciosa, el objetivo del estudio puede ser caracterizar la respuesta celular a un organismo conocido. En otras infecciones como la lepra el objetivo es caracterizar los elementos de una respuesta inmune defectuosa. En enfermedades de naturaleza

desconocida como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y sarcoidosis, se realizan estos estudios con para un un mejor conocimiento de los mecanismos que pueden influir en la aparición de la enfermedad. Hasta ahora este objetivo no se ha conseguido pero se han encontrado una serie de alteraciones que incluyen cambios en el índice OKT4/T8, incremento de los receptores Fc de los linfocitos T y células nulas, así como la aparición de anticuerpos antilinfocito. El estudio del líquido sinovial y pleural de los pacientes con artritis reumatoide muestra cambios considerables en la poblaciones linfocitarias con respecto a la sangre periférica. En algunas enfermedades autoinmunes hay evidencia de una actividad supresora disminuida y activación policlonal de células B, aunque no existe una interpretación clara de estos fenómenos.

2.9.6. Test de transformación linfoblástica.[132]

En algunos casos hay una alteración de la inmunidad no por un déficit cuantitativo en el numero total de linfocitos o de las subpoblaciones facilitadoras o citotóxicas supresoras sino por una alteración funcional caracterizada por una defectuosa proliferación de los linfocitos una vez que han entrado en contacto con el antígeno presentado por células accesorias. Para valorar esta etapa se utiliza el test de transformación linfoblástica (TTL).

La proliferación de los linfocitos se manifiesta por síntesis incrementada de DNA y RNA, incremento que es proporcional a dicha proliferación. Se cultivan los linfocitos del paciente con un mitógeno inespecífico. Los mas usados son:

a) Phytohemaglutinina (PHA); es una lectina extraida del Phaseolus Vulgaris que introducida en un cultivo de linfocitos estimula su proliferación de modo inespecifico pero predominantemente sobre linfocitos T.

b) Pokeweed Mitogen (PWM); es un extracto de Phytolaca Americana que tiene un efecto mitógeno inespecifico, predominantemente sobre los linfocitos B.

c) La concavalina A es un extracto de Concavalia eusiformes que actúa predominantemente sobre los linfocitos T periféricos mas inmaduros, provocando a su vez la secreción de factores inhibidores de la migración y de factor blastogénico inespecífico. Puede a su vez afectar a los linfocitos B interfiriendo con la producción de anticuerpos.

Tras tres a cinco días de incubación se inicia la blastogénesis que se manifiesta por síntesis de DNA. Para valorar esta transformación de linfocitos en linfoblastos pueden utilizarse dos métodos:

a) método morfológico. Consiste en la observación al microscopio de un frotis del cultivo teñido con una tinción de May-Grunwald. Este método es lento y engorroso.

b) método isotópico. Tras los tres-cinco días de incubación se añade timidina tritiada que se incorpora al DNA recién sintetizado y se mide la radioactividad con un contador de centello beta. Los resultados se miden en cuentas por minuto, se comparan con un control y el resultado se expresa como índice.

Este test tiene una gran utilidad también para estudiar reacciones alérgicas in vitro, sin riesgo para el paciente de someterse a un test de provocación. La técnica es la misma, solo que los linfocitos se cultivan con el alergeno (medicamento o producto alimentario) sospechoso en distintas diluciones.[59,132]

El test de transformación linfoblástica tiene numerosos campos de aplicación:[132]

1.- Clinicamente, el análisis de la transformación de los linfocitos proporciona un medio práctico y adecuado para descubrir e incluso monitorizar estados de deficiencia inmunológica adquirida. Proporciona un indicador sensible de función linfocitaria deprimida. Sirve también para monitorizar la eficacia de tratamientos inmunosupresores e inmunoestimulantes tales como trasplantes de médula ósea, factor de transferencia y hormona tímica. En pacientes con cáncer hay disminución de la función linfocitaria que mejora tras resección o quimioterapia. Por tanto, este test puede ser utilizado para evaluar la eficacia del tratamiento y establecer un pronóstico.

2.- Comparando la reacción proliferativa in vitro de células cultivadas en el propio suero del paciente y en otro suero homólogo puede detectarse si el defecto de los linfocitos es intrínseco o debido a factores tóxicos extrínsecos en el suero del paciente.

3.- El análisis de la transformación de los linfocitos tiene un gran potencial como técnica diagnóstica para detectar una exposición previa a varios patógenos. Por ejemplo, en el paludismo, hepatitis, infección por mycoplasma pneumonie, enfermedad periodontal y ciertas infecciones virales, una exposición previa sólo puede detectarse por la proliferación in vitro en respuesta al antígeno ya que la mayoría de los sujetos no tienen anticuerpos séricos detectables. Igualmente, puesto que en varias enfermedades autoinmunes los antígenos sólo estimulan la transformación de los linfocitos en pacientes con esta condición, esta reacción proporciona una evidencia diagnostica poderosa para detectar enfermedades autoinmunes.

Además, los antígenos responsables para la alergia estimulan específicamente la reacción proliferativa in vitro, porque las reacciones alérgica inmediatas así como reacciones a antígenos de contacto ocurren en respuesta a antígenos dependientes del timo. Por tanto, el test de transformación linfoblástica puede ser utilizado para diagnosticar una alergia y conocer el alergeno.

4.- Es evidente que una tipificación segura de la histocompatibilidad de donantes y receptores de órganos sólo puede hacerse usando reacciones con linfocitos mezclados. Esto está basado en la observación de que la respuesta de transformación in vitro se produce por linfocitos mezclados de sujetos diferentes, no idénticos. La supervivencia del injerto se correlaciona mejor con la respuesta a los linfocitos mezclados que con la identidad del antígeno de histocompatibilidad.

5.- Hay varias aplicaciones experimentales que merecen ser mencionadas. La capacidad funcional de los linfocitos B y T puede determinarse y permite por tanto una localización más exacta de un determinado defecto inmunitario. Además, el test puede utilizarse para detectar una hiperreactividad de las subpoblaciones de células T, tales como las células T supresoras, como se demuestra por la observación de que las células T de pacientes con inmunodeficiencia variable, cuando se añaden a cultivos de linfocitos normales, suprimen su capacidad de producir inmunoglobulinas in vitro.

CAPITULO III

LA INMUNIDAD EN EL PACIENTE ALCOHOLICO

En relación con el alcohol se han descrito numerosas alteraciones de la inmunidad y aceptado que el alcohólico tiene mayor predisposición a tener infecciones.

3.1. INMUNIDAD HUMORAL

En voluntarios sanos la administración intravenosa de alcohol disminuye la actividad bactericida del suero frente a cultivos de Haemophilus Influenzae, E. Coli y Citrobacter.

En perros la infusión intravenosa de alcohol etílico disminuye el poder bactericida del suero así como el complemento hemolítico total.

Estos dos estudios hacen referencia al consumo agudo de alcohol pero no al efecto a largo plazo.

Al estudiar la actividad bactericida del suero de 27 pacientes con cirrosis alcohólica se encontró que 22 (88%) tenían una actividad bactericida deficiente limitada a anticuerpos de la clase IgM.

También se detectaron anormalidades en la activación de la vía alterna del complemento.

Experimentalmente ha sido demostrado un atrapamiento reducido de antígenos e inmunocomplejos circulantes por el hígado de ratas cirróticas comparadas con los controles.

Se ha demostrado un descenso de C3 en los alcohólicos posiblemente en relación con una síntesis hepática disminuida.

3.2.- FUNCION DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

Leucopenia[109,110] se ve con frecuencia en los pacientes cirróticos, pero en este caso el alcohol no puede jugar ningún papel, sino que la causa está en un hiperesplenismo.

El pool de reserva de los granulocitos está disminuido aunque no se ha aclarado el posible papel causal de la malnutrición, enfermedad hepática o toxicidad directa del alcohol.

El etanol suprime el crecimiento de colonias granulociticas en los cultivos de médula ósea, crecimiento que no se recupera añadiendo factores madurativos como ácido folico, vitamina B_{12} o piridoxina.[172]

Diversos defectos de la función de los leucocitos como la adherencia y la quimiotaxis se han descrito en el enfermo alcohólico.[61]

En el estudio de Crowley y Abranson[42] no fueron encontrados defectos de la quimiotaxis hasta que no se alcanzaron concentraciones elevadas de etanol.

El estudio de Brayton y cols[22] ha demostrado defectos en la movilización de los leucocitos con solo baja a moderada intoxicación por alcohol. Sin embargo, estos defectos han sido estudiados tras intoxicaciones agudas y no en alcoholismo crónico.

Mc Gregor y cols[115] establecieron una diferencia entre los efectos del abuso agudo y crónico del alcohol de tal manera que la adherencia y movilización

de los granulocitos estaba inhibida en la intoxicación aguda, mientras que los defectos de la quimiotaxis fueron observados solamente en los alcohólicos crónicos, aunque no se ha comentado si la malnutrición o la hepatopatia puedan haber influido en un descenso del complemento.

Se ha sugerido que el suero de los pacientes cirróticos contiene un factor inhibidos de la quimiotaxis de los leucocitos. De Meo y cols[45] demostraron un severo deterioro de la quimiotaxis que podría también ser evidenciada cuando los granulocitos normales son incubados con suero de pacientes cirroticos. La quimiotaxis de los polimorfonucleares de los cirroticos vuelve a la normalidad tras la incubación con suero de individuos normales.

3.3.- FUNCION DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES

Varias alteraciones de los fagocitos mononucleares han sido descritas en pacientes alcohólicos[61,111] describiendo las mismas alteraciones de la quimiotaxis, movilidad y fagocitosis que en los polinucleares.

Ultimamente se están estudiando mucho las alteraciones iónicas en el interior de las células de los pacientes con hepatopatía y como la mayor parte son alcohólicos resulta imposible separar el papel que juegan uno y otro. Aunque no es del todo concluyente, parece ser que la actividad Na-K-ATP de la membrana leucocitaria esta alterada.[61,161]

La capacidad de ingestión y bactericida así como el metabolismo oxidativo de los leucocitos y monocitos estan también disminuidos.[111]

Otras alteraciones enzimáticas de los leucocitos (disminución de la lisozima esterasa y variaciones en la mieloperoxidasa) y granulocitos (hidrolasa ácida) podrían explicar estos defectos funcionales.[61]

3.4.-INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

Solamente unos pocos estudios de la función inmune celular han sido hechas en alcohólicos.

La respuesta a la fitohemaglutinina ha sido estudiada en pacientes con cirrosis hepática. En algunos estudios la respuesta al mitógeno fue normal, aunque la incubación de linfocitos con suero del paciente produce un evidente fallo en la respuesta. Un factor termolabil parece ser responsable. En otros, hay una falta de proliferacion linfocitaria.

La sensibilización primaria con dinitrocloro benceno y agentes similares ha sido estudiada en pacientes alcohólicos y experimentalmente en ratas. En ambos casos se ha encontrado una deficiente inmunidad célulo-mediada, posiblemente relacionada con el deterioro del atrapamiento de antigenos por los macrófagos.

De otra parte, la respuesta célulo-mediada fue encontrada normal en sujetos alcohólicos que no estaban malnutridos.

Los linfocitos T se han encontrado disminuidos en pacientes con hepatopatía alcohólica.[16] Uribarrena[176] ha estudiado los linfocitos T y células nulas en pacientes con hepatopatía alcohólica, y los compara según el grado de afectación hepática (esteatosis o hígado normal, hepatitis alcohólica o cirrosis); encuentra que el número de linfocitos T era normal en todos, aunque los pacientes con hepatitis alcohólica tienen

menor tendencia a formar rosetas y menor números de células nulas.

Se ha encontrado también que los pacientes cirróticos cuando desarrollan una descompensación hepática severa presentan un descenso considerable de los linfocitos T junto con aumento de los linfocitos nulos. Esto se explica por un secuestro esplenico y/o incapacidad de los órganos linfoides en modular linfocitos T.

Por último, varias publicaciones recientes demuestran una actividad citotóxica incrementada en pacientes con hepatopatía alcohólica, especialmente en aquellos con hepatitis alcohólica aguda.

SEGUNDA PARTE

APORTACION PERSONAL

CAPITULO IV

OBJETIVOS

4.1. FUNDAMENTOS Y MOTIVACIONES.

La literatura médica esta repleta de citas que describen una mayor susceptibilidad de los alcohólicos a padecer infecciones graves.

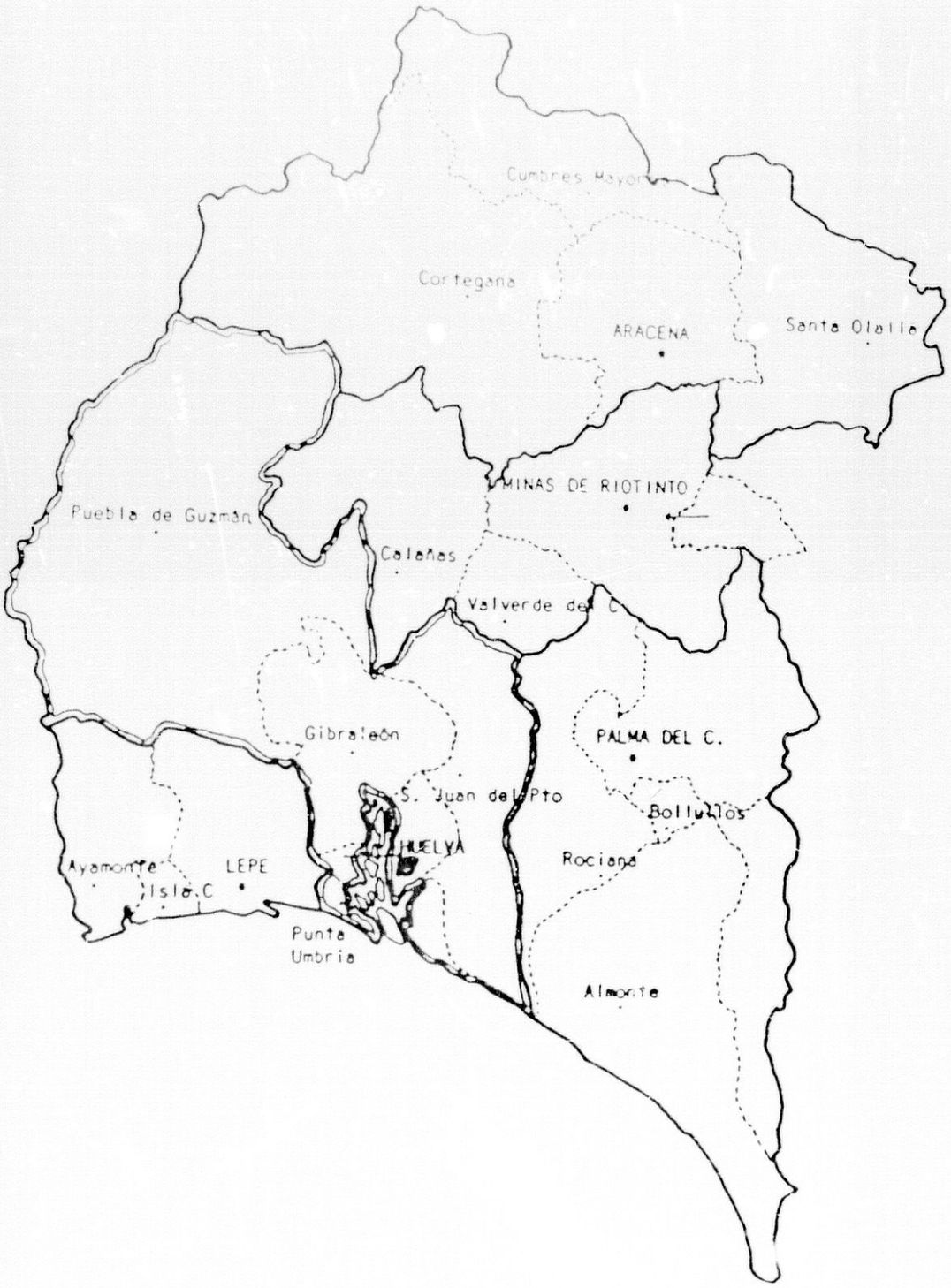
Por otra parte, en la última década ha existido una gran preocupación por el comportamiento de la inmunidad en los pacientes alcohólicos, pero de la lectura de esta bibliografía se desprende:

a) Los estudios están realizados en pacientes con cirrosis hepáticas alcohólica, enfermedad que por si misma o por la malnutrición que conlleva produce alteraciones del sistema inmunitario, pero no se ha separado el alcoholismo de su repercusión orgánica.

b) La inmunidad celular está insuficientemente estudiada en el paciente alcohólico sin hepatopatia y no se han hecho estudios funcionales concluyentes que puedan poner de manifiesto defectos cualitativos de la inmunidad celular en alcohólicos crónicos sin hepatopatia.

La zona atendida por el Hospital donde hemos realizado esta Tesis Doctoral corresponde al área norte de la provincia de Huelva (Fig.XII). Comprende una población de 93.760 habitantes, con hábito alcohólico marcado; efectivamente, sus habitantes, dedicados fundamentalmente a la minería y agricultura, tienen la costumbre de tomar bebidas de destilación alcohólica de alta graduación (aguardiente de 55º); esta costum-

FIGURA XII.- Mapa sanitario de Huelva



bre fue potenciada por la colonia inglesa implantada en la cuenca minera de Riotinto, denominando a esta bebida "men water";[9] esta denominación ha pasado al castellano deformada por una mala pronunciación del ingles con el nombre de "manguara". Afortunadamente, desde fechas recientes, la legislación no permite la fabricacion de bebidas de tan alta graduación.

No existen datos publicados sobre la ingesta alcohólica media en nuestra zona y los datos obtenidos en una consulta de hospital pueden estar sesgados. Sin embargo, una alta incidencia de patología derivada del alcohol nos ha movido a aprovechar las especiales características de la comarca para estudiar la inmunidad en los pacientes alcohólicos.

4.2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1.- Estudiar el comportamiento de la inmunidad humoral y celular en pacientes alcohólicos sin hepatopatía y sin alteración del estado nutricional, para detectar:

a) Alteraciones inmunitarias de tipo cuantitativo.

b) Alteraciones inmunitarias de tipo cualitativo mediante la realización de un test de transformación linfoblástica frente a mitógenos inespecíficos.

2.- Buscar una relación entre estas posibles alteraciones y :

a) grado de ingesta alcohólica

b) marcadores biológicos de alcoholismo

3.- Realizar estos mismos estudios en un grupo de pacientes con cirrosis hepática alcohólica para:

a) ver si las alteraciones inmunitarias que pudieran aparecer en estos pacientes son las mismas o distintas de los alcohólicos sin hepatopatía.

b) Intentar extraer conclusiones etiopatogénicas.

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOS

5.1.- MATERIAL

Hemos estudiado 73 pacientes correspondientes a consultas externas y área de hospitalización del Hospital General de Riotinto.

Se han excluido las mujeres, al igual que en otros estudios similares basados en la cantidad de alcohol ingerido por el sujeto y que tiene que ser declarada por este, debido a la tendencia a ocultar el habito alcohólico sobre todo en ambiente rural, lo que traeria como consecuencia un falseamiento de los resultados. Todos los pacientes objeto de este estudio son por tanto varones.

Se han excluido también todos aquellos pacientes con alguna patología que interfiera con la inmunidad como enfermedades infecciosas agudas o crónicas, neoplasias, enfermedades autoinmunes, síndromes de inmunodeficiencia congénitos o adquiridos, diabetes, insuficiencia renal, hipoproteinemia, malnutrición.

Ningún paciente habia recibido medicación que pudiese interferir con el sistema inmunitario, citostáticos, inmunosupresores, corticoides ni teofilinas en ningún momento; tampoco habían recibido antibioticos en los últimos seis meses.

Los pacientes se han distribuido en los siguientes grupos (Cuadro V):

Grupo A: constituido por 58 pacientes sin hepatopatia. A su vez se distribuyen de la siguiente manera.

Grupo A1.- Bebedores sociales. Este grupo consta de 23 pacientes que beben menos de 80 g. de etanol diarios.

Grupo A2.- Bebedor excesivo. Este grupo consta de 14 pacientes que ingieren diariamente de 80 a 160 g. de etanol durante un periodo de al menos 10 años.

Grupo A3.- Bebedor inveterado. Esta constituido por 21 pacientes que consumen diariamente mas de 160 g. de etanol durante los últimos 10 años al menos.

Grupo B: Formado por 15 pacientes con cirrosis hepática alcohólica confirmada por histología. Estos 15 pacientes pertenecen al estadío A de la clasificción de Child; no consumen alcohol desde el diagnóstico de su padecimiento.

CUADRO V.- MATERIAL

Nº total de pacientes:.....73

Grupo A.- Sin afección hepática.....58

A1.-Bebedor social:-80 gr./día.....23

A2.-Bebedor excesivo:80-160 gr./día/10 años...14

A3.-Bebedor inveterado:+160 gr./día/10 años...21

Grupo B.- Con cirrosis hepática.....15

5.2. METODOS

5.2.1. Ingesta alcohólica

Para conocer la ingesta de bebidas alcohólicas se ha realizado una encuesta a todos los pacientes que se expone en el Cuadro VI.

5.2.2. Calculo real del etanol ingerido

Para este calculo nos hemos basado en los siguientes datos:

5.2.2.1 Graduación de las bebidas alcohólicas

La graduación de una bebida alcohólica representa el porcentaje de bebida que corresponde a alcohol etilico.

Las bebidas habitualmente consumidas en nuestro medio tienen la siguiente graduación: (Cuadro VII)

a) Vino de mesa: 8º

b) Cerveza: 4'5º

c) Vinos finos (jerez, manzanilla, etc): 14'5º

d) Brandys, Coñac y Anís: 40º

e) Aguardiente: 55º. Recientemente la legislación no permite la fabricación de bebidas alcohólicas que sobrepasen los 45º, pero esta normativa es posterior a la realización de este estudio y hasta entonces tenia 55º.

f) Whisky: 42º

g) Ginebra: 40º

5.2.2.2. Volumen ingerido:

a) Tanto la cerveza como el vino de mesa lo hemos expresado en litros ya que de esta forma es mas fácil que el paciente indique la cantidad bebida.

b) Para el resto de las bebidas hemos determinado exactamente el volumen que se expende de cada una. Para ello hemos realizado un muestreo en distintos establecimientos de bebidas de la comarca y midiendo el volumen de cada bebida con una probeta; el resultado que se expresa es la media de todas las determinaciones(Cuadro VII).

-Los vinos finos se expenden en catavinos y contienen 55 ml. de vino.

-Los brandys y anis en copas que contienen 60 ml.

-El aguardiente suele servirse en vaso diluido a partes iguales con agua. Cada vaso contiene 45 ml. de volumen.

-El whisky suele suministrarse en vaso que contiene 75 ml. de bebida.

-La ginebra se suele tomar mezclada con diversos tipos de bebidas carbónicas. El volumen de ginebra que contiene cada vaso es de 72 ml.

5.2.2.3. Transformación en gramos del etanol ingerido.

Para ello hemos aplicado la siguiente fórmula:

$$\text{Etanol (g)} = \frac{\text{Vol bebida (ml)} \times \text{Graduación} \times \text{densidad etanol } (0'81)}{100}$$

Esta fórmula se aplica a cada tipo de bebida que consume el paciente y se suman todos los gramos en los casos en que suele tomar mas de una bebida alcohólica.

5.2.3. Cálculo del índice corporal.

Para este cálculo se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Indice corporal} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Talla (m)}^2}$$

CUADRO VI

PACIENTE..... Edad.....

Hª Cª..... Fecha.....

Enfermedad actual

Enfermedades acompañantes

Peso..... Talla.....

Encuesta alcohólica

Vino de mesa (litros).....

Vino fino (copas).....

Cerveza (litros).....

Coñac, Anis (copas).....

Aguardiente (vasos).....

Whisky (unidades).....

Cubalibre y similares (unidades)...

Otros.....

¿Cuando comenzó a beber?

¿Cuando fue la última vez que tomó bebidas alcohólicas?

¿Ha tenido algún problema como consecuencia de la bebida?

CUADRO VII

CALCULO DE LA INGESTA ALCOHOLICA (En ml)

BEBIDA	VOLUMEN	%ALCOHOL ETILICO
Cerveza	Litros	4'5%
Vino de mesa	Litros	8%
Vinos finos	Copa (50 ml)	16'5%
Aguardiente	45 ml	55%
Ginebra	72 ml	40%
Whisky	75 ml	42%
Brandy, Anis	60 ml	40%

TRANSFORMACION DEL ETANOL INGERIDO EN GRAMOS

$$\frac{\text{Volumen x densidad (0'81) x graduación}}{100}$$

5.2.4. Biopsia hepática.

A aquellos pacientes con signos clínicos de hepatopatía o alteración de algún parámetro que indicase afección hepática (albúmina, globulinas, GOT, GPT, F alcalina, bilirrubina, protrombina) se les ha realizado laparocospia y/o biopsia hepática percutanea. Si no se podía realizar biopsia hepática por alguna contraindicación quedaba excluido del estudio.

Solo se incluyen en el estudio los pacientes con:

a) hígado sano.

b) cirrosis hepática micronodular establecida. No se han incluido pacientes con esteatosis ni hepatitis alcohólica. Solo se incluyen pacientes cirróticos en estadío A de la clasificación de Child[31] modificada por Pugh[143] (Cuadro VIII).

5.2.5 Determinaciones analíticas

A todos los pacientes se le han realizado las siguientes determinaciones:

Hematíes, hemaglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración corpuscular media de hemoglobina, recuento leucocitario, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos, plaquetas, VSG, actividad de protrombina, glucosa, urea, creati-

CUADRO VIII.- Clasificación de Child-Pugh

	1 Punto	2 Puntos	3 Puntos
Ascitis	no	facil control	pobre control
Encefalopatía	no	I-II	III-IV
Bilirubina(mg/dl)	<2	2-3	>3
Albúmina(g/dl)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Protrombina(seg.)	1-4	4-6	>6
(actividad)	>65%	50-65%	<50%

Estadio A 5-6 puntos

Estadio B 7-9 puntos

Estadio C 10-15 puntos

nina, ácido úrico, bilirrubina total, transaminasa glutámico-oxalacética(GOT), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), gamma glutamil transpeptidasa (Gamma GT), F. alcalina, proteinograma, IgG, IgA, IgM, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos facilitadores, linfocitos citotóxicos supresores, índice de linfocitos facilitadores/supresores-citotóxicos y test de transformación linfoblástica frente a mitógenos (TTL).

5.2.5.1. Realización del test de transformación linfoblástica

5.2.5.1.1. Material:

Ficoll

Medio de cultivo 199(Gibco), 20 mM L-Glutamina, pH: 7,25

Solución Salina esteril (ClNa, 9 g/l)

Fitohemaglutinina (PHA, Gibco)

Pokeweed Mitogen (PWM, Gibco)

Concavalina A (ConA, Pharmacia)

Placa de Cultivos Microtiter (Nunc0)

H3-Metil Timidina (amerrsham)

Filtro Whatman GF/C

5.2.5.1.2. Muestra:

15 ml de sangre total desfibrinada, estéril.

5.2.5.1.3. Método:

Todo el proceso ha de realizarse en condiciones de esterilidad.

Diluir 15 ml de sangre estéril con 15 ml de solución salina estéril, en tubos de cristal de 12x16, dispensar 3 ml de Ficoll estéril y sobre el mismo dispensar 9 ml de la sangre diluida. Tener especial precaución de que no se mezclen ambas fases.

Centrifugar los tubos a 600 g durante 20 minutos.

Mediante una pipeta pasteur, recoger la interfase linfocitaria y transferirla a un tubo de cristal de 12x16. Llenar el tubo completamente con solución salina y centrifugar a 600 g durante 5 minutos.

Vaciar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular con 10 ml de solución salina, agitando el tubo en un agitador de torbellino. Centrifugar a 600 g durante 5 minutos. Repetir este proceso una vez más.

Tras el último lavado de los linfocitos, resuspender en medio de cultivo suplementado con un 20% de suero humano descomplementado y ajustar la concentración linfocitaria a razón de $1x10^6$ linfocitos/ml.

Paralelamente al proceso de separación y lavado de los linfocitos, proceder a montar las diluciones de los distintos mitógenos en una placa de cultivos. Para ello, dispensar en pocillos

duplicados los mitógenos:

Pocillo	Contenido
1,2	0,1 ml medio de cult. (control estumul. basal)
3,4	0,1 ml PHA (dilución 10 ug/ml en medio de cult)
5,6	0,1 ml PHA (" 5 ug/ml ")
7,8	0,1 ml PWM (" 10 ug/ml ")
9,10	0,1 ml PWM (" 5 ug/ml ")
11,12	0,1 ml ConA (" 25 ug/ml ")
13,14	0,1 ml ConA (" 12 ug/ml ")

Realizados los procesos de montaje de las placas y separación de los linfocitos de la muestra, se procede a incorporar los linfocitos a la placa, para ello dispensar 0,1 ml de la suspensión de linfocitos ajustada a $1x10^6$ linfocitos/ml en cada uno de los 14 pocillos.

Incubar la placa de cultivos en una estufa de cultivos a 37º C y con una atmósfera del 5% de CO_2 durante 4 días.

Al cuarto día incorporar un pulso (20 ul) de Timidina Tritiada (0'2) e incubar en la estufa durante 18 horas.

Transcurridas las 18 horas, se procede a recoger las células mediante un recolector de células (Harvester, Skatron) sobre un filtro de fibra de vidrio (GF/C, Whatman). Secar los filtros en estufa a 60º C durante una hora. Final-

mente transferir los filtros a miniviales a los que se les incorpora 1 ml de líquido de centelleo (toueno + PPO + POPOP), tras lo cual se procede al contaje de la radiación emitida mediante un contador de centelleo liquido (Contador de radiación beta, Beckman LS-7000) durante 1 minuto.

Los valores obtenidos en la medición de la radioactividad emitida por los filtros, vienen expresados en c.p.m. (cuentas por minuto).

Los resultados de estimulación blástica de los distintos mitógenos, se obtienen calculando el índice de estimulación de la siguiente manera:

Calcular la media de las c.p.m. de los duplicados.

El índice de respuesta para cada dilución del mitógeno, se expresa como función de las c.p.m. del control de estimulación basal.

$$\text{índice de estimulación} = \frac{\text{c.p.m. de mitogenos+linfocitos}}{\text{c.p.m. del control linfocitos basal.}}$$

5.2.5.1.4 Valores de referencia

			media	2 D.S.
PHA (0'05)	5 ug/ml	indice:	60	35
PHA (0'10)	10 ug/ml		76	31
PWM (0'05)	5 ug/ml		35.1	20
PWM (0'10)	10 ug/ml		54.2	34.8
ConA(0'05)	12 ug/ml		36.1	24.2
ConA(0'10)	25 ug/ml		41.8	19.8

5.2.5.2 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T (T_3 o linfocitos totales, T_4 o linfocitos facilitadores y T_8 o linfocitos citotóxicos-supresores)

5.2.5.2.1. Material

Tampon fosfato salino (PBS) pH 7.2

Dextrano T 400 (Pharmacia) 5% en PBS

Ficoll (Pharmacia) densidad 1.080

Medio de cultivo 199 (Gibco)

Anticuerpos monoclonales ORTHO, OKT_3, OKT_4, OKT_8

Anticuerpos de cabra contra IgG de ratón marcado con FITC

5.2.5.2.2. Muestra

10 ml de sangre total desfribrinada

5.2.5.2.3. Método

Añadir a 10 ml de sangre total, en un tubo de vidrio, 2 ml de una solución de Dextrano T400 (5% en PBS). Mezclar por inversión del tubo 2 ó 3 veces e incubar a 37º C en baño de agua durante 30 minutos.

Transcurridos los 30 minutos, los eritrocitos habrán sedimentado, separar el sobrenadante mediante una pipeta pasteur transfiriendolo a otro tubo de vidrio de 12x16 que llevará incorporados 3 ml de Ficoll (densidad 1.080). Tener la precaución de no mezclar el ficoll con el sobrenadante, añadir 10 ml de PBS y centrifugar.

Ajustar la concentración de linfocitos a $1x10^7$ células/ml con medio de cultivo 199.

Rotular 4 tubos: Control, OKT_3, OKT_4 Y OKT_8. Añadir 5 ul de PBS al tubo Control y 5 ul de cada uno de los anticuerpos monoclonales a su tubo correspondiente. Añadir a los tubos 100 ul de la suspensión celular, agitar con un agitador de torbellino e incubar en baño de hielo durante 30 minutos.

Añadir 3 ml de PBS frío a los tubos y centrifugar a 600 g 5 minutos. Desechar el sobrenadante. Repetir la operación. Añadir 100 ul de anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con FITC diluido 1:20 en medio 199 a cada tubo.

Agitar con una agitador torbellino e incubar a 4º C durante toda la noche.

Añadir 3 ml de PBS frio a cada uno de los tubos y centrifugar a 600 g durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y agitar vigorosamente. Resuspender los sedimentos con 2 gotas de medio de montaje (PBS + glicerol). Depositar 20 ul de cada una de las muestras en un porta objetos, aplicar un cubre y efectuar la lectura bajo luz ultravioleta.

Efectuar contaje de % de linfocitos marcados fluorescentes respecto al total de linfocitos.

5.2.5.2.4. Valores de referencia

Linfocitos T totales (T_3) :65-80%

Linfocitos T inductores-cooperadores (T_4):35-55%

Linfocitos T citotóxicos-supresores (T_8) :20-35%

Para el cálculo en ml^3 se utiliza un hemograma extraido el mismo día.

5.2.5.3. Identificación y recuento de linfocitos B

5.2.5.3.1. Material

Ficoll (Pharmacia) densidad 1.080

Antisuero anti-Ig humana (Fab2) marcada con FITC

PBS + 1% N_3Na

5.2.5.3.2. Muestra

10 ml de sangre total desfibrinada.

5.2.5.3.3. Método

Separar y purificar los linfocitos mediante gradiente de Ficoll y posteriores lavados como en el protocolo de las subpoblaciones linfocitarias T. Ajustar la concentración linfocitaria a $4x10^6$ células/ml.

Añadir a un tubo de hemolisis 50 ul de anti-suero anti-Ig humana marcado con FITC (fragmento Fab_2) diluido 1:20 en PBS + 1% N_3Na,
y 50 ul de la suspensión linfocitaria.

Incubar 45 minutos a 4º C. Agitar un par de veces durante la incubación.

Lavar 3 veces con PBS + 1% N_3Na, desechando el sobrenadante.

Resuspender el sedimento con 2 gotas de PBS + glicerol. Depositar 20 ul de la muestra en un portaobjetos, aplicar un cubre y examinar en un microscopio de fluorescencia.

Efectuar un contaje de linfocitos marcados respecto al total de linfocitos.

5.2.5.3.4 Valores de referencia

Linfocitos con Ig de superficie oscila entre 6 - 15%. Para el cálculo de linfocitos B por mm^3 se procede exactamente igual que en el caso de los linfocitos T.

5.2.5.4. Determinaciones de hematimetría.

5.2.5.4.1 Muestra

4 ml de sangre venosa que se colocan en un tubo esteril Vacutainer 15% Edta (K_3) (Becton Dickinson).

5.2.5.4.2 Método

Las determinaciones se han realizado en un contador automático de partículas Technicon H_1, según técnica normalizada para el hospital.

5.2.5.4.3 Valores de referencia

Hematies: 4,5 - 6 x $10^6/mm_3$

Hemoglobina: 14 - 18 g/dl

Hematocrito: 41 - 51 %

Volumen corpuscular medio (VCM): 80 - 94 micras^3

Concentración media de hemoglobina (CMH): 27 -33 pg

" corpuscular media de hemoglobina(CCMH):32-36pg/dl

Leucocitos: 4000 - 10000/mm^3

Neutrófilos (valor absoluto): 2000 - 7000/mm^3

Eosinófilos (" "): 100 - 600/mm^3

Basófilos (" "): 0 - 100/mm^3

Monocitos (" "): 100 - 800/mm^3

Linfocitos (" "): 1500 - 5000/mm^3

Plaquetas: 150000 - 400000/mm^3

5.2.5.5 Determinación de la velocidad de sedimentación

5.2.5.5.1 Muestra

Extracción de 1,5 ml de sangre venosa que se introduce en pipeta de sedimentación Sed Tainer (Becton Dickinson)

5.2.5.5.2 Método

Según técnica convencional utilizada en el laboratorio de nuestro hospital.

5.2.5.5.3 Valor de referencia

Menos de 15 mm a la 1ª hora.

5.2.5.6 Determinación del tiempo protrombina.

5.2.5.6.1 Reactivos

Tromboplastina de cerebro de conejo (Grifols)

5.2.5.6.2 Muestra

4 cc de sangre venosa que se introduce en un frasco B-D Vacutainer (Becton Dickinson).

5.2.5.6.3 Método

Según técnica convencional realizada en el laboratorio de nuestro hospital en un coagulómetro K - C_4 - A (Dade).

5.2.5.6.4 Valor de referencia

70 - 100% actividad.

5.2.5.7 Determinaciones bioquímicas

Glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, GOT, GPT, Gamma glutamil transpeptidasa, bilirrubina, fosfatasa alcalina.

5.2.5.7.1 Muestra:

4 cc de sangre venosa que se vierten en tubo Vacutainer SST (Becton Dickinson).

5.2.5.7.2 Reactivos

Boehringer Manheim

5.2.5.7.3 Método

Las determinaciones se han realizado en un autoanalizador multicanal Hitachi 705, a 37º.

Para la determinación de glucosa se ha utilizado la técnica de glucosa hexoquinasa.

Para la determinación de urea se ha utilizado el método cinético ultravioleta.

Para la determinación de ácido úrico el método úrico PAP.

Para la determinación de creatinina el método JAFFE.

Para las transaminasas glutámico oxalacética y pirúvica el método de cinética ultravioleta según IFCC.

Para la dosificación de gamma glutamil transpeptidasa se ha utilizado el método de la L glutamiltransferasa.

Para la fosfatasa alcalina: método de la fosfatasa alcalina optimizada.

Para la bilirrubina el método Jendrassik.

5.2.5.7.4 Valores de referencia

Glucosa: 70 -110 mg/dl

Urea: 15 - 40 mg/dl

Creatinina: 0,6 - 1,5 mg/dl

Bilirrubina total: 0,3 - 1 mg/dl

GOT: hasta 37 u/l

GPT: hasta 40 u/l

Gamma GT: 11 - 50 u/l

Fosfata alcalina: 98 - 279 u/l

5.2.5.8 Proteinograma

5.2.5.8.1 Muestra

Extracción de 4 cm^3 de sangre venosa en frasco Vacutainer SST de Becton-Dickinson.

5.2.5.8.2 Metodo

Electroforesis sobre acetato de celulosa teñido de negro amido y lectura en un fotodensímetro monocanal Atom, todo ello según técnica convencional en el laboratorio de bioquímica de nuestro hospital.

5.2.5.8.3 Valores de referencia

Proteinas totales:	60	-	80	g/l
Albúmina:	35	-	50	g/l
Alfa1 globulinas:	1,6	-	3,4	g/l
Alfa2 globulinas:	4,5	-	8,5	g/l
Beta globulinas:	5,3	-	10	g/l
Gammaglobulinas:	9,1	-	17	g/l

5.2.5.9 Determinación de inmunoglobulinas

5.2.5.9.1 Muestra

4 cc de sangre venosa en un tubo Vacutaimer SST de Becton Dickinson.

5.2.5.9.2 Método

Según técnica convencional en nuestro laboratorio de bioquímica, utilizando técnica de turbidometria del Instituto Behring y en un aparato Behrin turbidimeter.

5.2.5.9.3 Valores de referencia

IgG: 800 - 1800 mg/dl.

IgA: 90 - 450 mg/dl.

IgM: 60 - 250 mg/dl.

5.2.6.- Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico (datos no pareados) hemos realizado el test de Studen cuando las variables eran homogéneas y la prueba de Mann-Whitney para variables no homogéneas; todo ello se ha efectuado con un paquete integral denominado SIGMA, de HORUS HARWARD,S.A.

CAPITULO VI

RESULTADOS

De cada uno de los sujetos estudiados hemos recogido una serie de datos con los que hemos elaborado un protocolo que aparece reflejado en el Cuadro IX.

De estos datos manejamos los siguientes:

La edad y el indice corporal como parámetros demostrativos de la homogeneidad de la muestra.

Ingesta alcohólica, motivo fundamental del estudio y que permite clasificar a los pacientes en subgrupos A_1, A_2 y A3.

Volumen corpuscular medio (VCM) y gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) como marcadores de alcoholismo.

Actividad de protombina (AP), transaminasas glutámico oxalactica (GOT) y glutámico pirúvica (GPT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total (BT), proteinas totales (PT), albúmina (Alb), alfa 1 globulinas (Alfa 1), alfa 2 globulinas (Alfa 2), betaglobulinas (beta), gammaglobulinas (gamma) y cociente GOT/GPT como marcadores de afectación hepática.

Leucocitos totales, neutrófilos y monocitos como células participantes de manera inespecífica en el sistema inmune.

Inmunoglobulinas Ig G, Ig A e Ig M para valorar el estado de la inmunidad humoral.

Poblaciones linfocitarias: linfocitos totales, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos facilitadores (OKT4), linfocitos citóxicos supresores (OKT8) e índice OKT4/OKT8.

CUADRO IX

Nombre Edad

Peso Talla Ingesta alc.

Diagnóstico

Hígado: Grupo

Hties	Proteínas T
Hbina	Albúmina
Hcrito	Alfa 1
Leucocitos T	Alfa 2
Neutrófilos	Beta
Eosinófilos	Gamma
Basófilos	IgG
Monocitos	IgA
Linfocitos	IgM
Plaquetas	Linf. B
VSG	Linf. T
Act.Protrom.	OKT4
Glucosa	OKT_8
Urea	T_4/T_8
Creatinina	PHA 0'05
A. Urico	PHA 0'10
Bilirrubina	PWM 0'05
GOT	PWM 0'10
GPT	Con A 0'05
F.alcalina	Con A 0'10
Gamma GT	
GOT/GPT	

Test de transformación linfoblástica con los mitógenos Fitohemaglutinina (PHA), Pokeweed mitogen (PWM) y Concavalina A (Con A).

Histología hepática que nos permite excluir los pacientes con cirrosis hepática del grupo de alcohólicos (A) y considerarlos un grupo aparte (B).

La tabla I muestra los valores medios y las desviaciones standard de cada uno de los parámetros que hemos seleccionado en cada uno de los cuatro grupos estudiados.

COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS

6.1.- EDAD E INDICE CORPORAL

La tabla II muestra la edad media y el índice corporal así como las diferencias significativas entre los distintos grupos; como puede apreciarse, no hay diferencias significativas y por tanto podemos considerarlos homogéneos.

6.2.-INGESTA ALCOHOLICA.

La Figura XIII representa, en un diagrama de barras, el consumo medio de alcohol en cada uno de los subgrupos A durante los últimos 10 años. En el grupo B el consumo es 0 ya que ninguno de los pacientes bebía desde el diagnóstico.

6.3.-MARCADORES DE ALCOHOLISMO

La Tabla III muestra los valores medios y las desviaciones standar del VCM en cada uno de los grupos estudiados.

La Figura XIV compara el VCM del grupo A1 con todos los demás grupos. Al pie de la figura se indican los valores medios. Se aprecia que el VCM del grupo A1 es significativamente mas bajo que todos los demás.

La figura XV compara el resto de los grupos entre ellos. Aunque el VCM va aumentando desde el grupo A2 hasta el B, las diferencias no son significativas.

Los valores medios de GGT así como sus desviaciones standard se indican en la Tabla IV. En las figuras XVI Y XVII se comparan estos valores de una forma gráfica, indicando la significación estadística.

Se observa que la GGT aumenta progresivamente con la ingesta alcoholica y alcanza su máximo valor en el grupo B aunque han abandonado el hábito enólico; sin embargo, las diferencias entre el grupo A1 y A2, es decir aquellos que beben menos de 80 y de 80 a 160 g. de alcohol no son significativas; en cambio a partir de 160 g. diarios el aumento es significativo y los cirróticos tienen valores significativamente mas altos que los que no tienen cirrósis hepática a excepción del grupo A3; aunque los valores son mucho mas altos en los cirróticos, las diferencias no son significativas debido a unas desviaciones standard muy amplias.

6.4.-MARCADORES DE AFECTACION HEPATICA

Las Tablas I_a y 1_b presentan los valores medios y desviaciones en cada uno de los grupos para aquellos parametros que hemos denominado marcadores de afectación hepática.

Como es de esperar los valores se encuentran dentro de la normalidad en el grupo A (pacientes sin cirrósis), homogeneos y sin diferencias significativas entre los subgrupos.

El grupo B muestra valores alterados con diferencias significativas con todos los demás grupos como corresponde a pacientes con cirrosis hepática confirmada.

La tabla V resume el resultado del tratamiento estadístico de estos parámetros.

El único parámetro que tiene un comportamiento distinto es el cociente GOT/GPT. Por ello lo describimos separadamente. En la Tabla VI se indican sus valores medios y desviaciones. En las Figuras XVIII y XXIX se representan gráficamente. Sus valores medios van aumentando progresivamente desde el grupo A1 al B 0.99, 1.26, 1.31 y 1.63 respectivamente). Sin embargo, sólo es significativa la diferencia entre el grupo A1 y todos los demás, es decir, entre los bebedores de menos de 80 g. de alcohol y los que beben mas de 80 g. o bien tienen una cirrosis hepática. Las diferencias entre los grupos A2, A3 y B no alcanzan significación

estadística.

6.5.-**LEUCOCITOS TOTALES, NEUTROFILOS Y MONOCITOS.**

En la Tabla VII se observa que los valores de estos parámetros son muy homogéneos entre los diferentes grupos sin que alcancen significación estadística al compararlos. Mas evidente aún resulta en las Figuras XX, XXI y XXII que corresponden a la representación gráfica de los valores medios de leucocitos, polimorfonucleares neutrófilos y monocitos respectivamente.

6.6.-**INMUNOGLOBULINAS**

Para el estudio de la inmunidad humoral hemos determinado las inmunoglobulinas Ig G, Ig A e Ig M en cada uno de los sujetos.

En la Tabla VIII aparecen los valores de cada una de las inmunoglobulinas en los grupos correspondientes.

En la Figura XXIII aparecen representados los valores de Ig G. Los subgrupos A1, A2 y A3 tienen valores muy similares. Los cirróticos (grupo B) tienen valores significativamente más elevados que el resto de los grupos. La Ig A está representada en la Figura XXIV y puede apreciarse un comportamiento similar al de Ig G; los subgrupos A1, A2, y A3 tienen valores semejantes pero el grupo B muestra unas cifras signi-

ficativamente elevadas. La Figura XXV muestra el comportamiento de la Ig M. Al igual que el resto de las inmunoglobulinas, sus valores medios están significativamente altos en el grupo B; por tanto el grupo B presenta un aumento significativo de todas las inmunoglobulinas. El grupo A3 (alcohólicos) tiene un aumento de Ig M (197 mg/dl) con respecto a los bebedores sociales (139 mg/dl) y los bebedores moderados (112 mg/dl) que son significativas ($p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente).

6.7.-POBLACIONES LINFOCITARIAS

6.7.1.-Linfocitos totales

La Tabla IX indica los valores de linfocitos totales en cada uno de los grupos. En la figura XXVI se observa la uniformidad de estas cifras que no alcanzan valores significativos entre ningún grupo.

6.7.2.-Linfocitos B y T.

En las Tablas X y XI aparecen reflejados los valores de linfocitos B y T.

En la Figura XXVII se representan los valores de los linfocitos B indicando sus valores absolutos que como puede verse son muy parecidos; hay un discreto descenso en el grupo B pero no es significativo.

Los linfocitos T muestran un discreto descenso desde el subgrupo A1 al A3 pero que no alcanza diferencias significativas, como puede apreciarse en la

Figura XXVIII. Los pacientes cirróticos (grupo B) tienen cifras de linfocitos T algo mas elevadas que el subgrupo A3 pero que no son en modo alguno significativas.

6.7.3.-Linfocitos facilitadores (OKT4) y citotóxicos supresores (OKT8).

Los valores de los linfocitos OKT4 aparecen descritos en la Tabla XII sin que existan diferencias significativas entre los grupos según el grado de ingesta alcohólica o la existencia de hepatopatía. La Figura XXIX permite apreciar un descenso de los linfocitos OKT4 desde el grupo A1 al grupo B no significativo.

En cambio los linfocitos OKT8 (Tabla XIII) tienen un comportamiento distinto. Están disminuidos en número en el grupo A3 que corresponde a los pacientes con alcoholismo acentuado y esta diferencia es significativa con respecto a los grupos de menor ingesta enólica. Aunque el grupo A3 también muestra valores inferiores a los del grupo B, no alcanza significación estadística. El grupo B muestra descenso de linfocitos OKT8 no tan acentuado como el grupo A3 pero que alcanza significación estadística al compararlo con el grupo A1 pero no con A2 ni A3 (Figura XXX).

En las Figuras XXXI y XXXII aparecen representadas en un diagrama de barras las comparaciones entre los distintos grupos para los linfocitos OKT8. Al pie

del diagrama aparecen los valores de cada grupo; se indica también la significación estadística entre aquellos grupos que la tienen.

6.7.4.-Indice OKT4/OKT8.

La Tabla XIV muestra los valores medios de este índice en cada uno de los grupos de sujetos estudiados (Fig. XXXIII). Comparándolo entre los distintos grupos se aprecia que los sujetos de los grupos A3 y B, es decir, los bebedores acentuados y los cirróticos, muestran unos valores muy similares y que son significativamente mas elevados que los de los sujetos que beben menos de 160 g. diarios de etanol como se ve graficamente en las Figuras XXXIV y XXXV.

6.8.-TEST DE TRANSFORMACION LINFOBLASTICA.

La Tabla XV muestran los resultados obtenidos al estimular los linfocitos en cada uno de los grupos con tres mitógenos inespecíficos y a dos diluciones distintas. Como se aprecia, los grupos A1, A2 y B tienen unos valores muy similares sin que existan diferencias significativas en la comparación estadística. En cambio, los sujetos del subgrupo A3 muestran valores significativamente mas bajos que todos los demás grupos. Esta falta de respuesta es significativa para cada uno de los mitógenos y para cada una de las diluciones aunque las mayores diferencias se establecen entre los grupos A1 y A3 para el mitógeno fitohemaglutinina.

En la Figura XXXVI representamos graficamente los resultados de la estimulación con mitógenos en cada uno de los grupos. Para mayor simplificación, solo escogemos para representar el valor de estimulación mas alto alcanzado con alguna de las dos diluciones.

TABLAS Y FIGURAS

TABLA I-a

	A1		A2		A3		B	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Edad	52.6	18.3	53.7	15.7	45	14.1	55.2	12
I.Q.	24.7	2.6	25.6	3.5	24.7	3.9	25	2.4
Ing. Alch.	58.8	11.9	131	23	289	163	---	---
VCM	87	6.3	95.1	7	96.3	7.1	99.7	13
GGT	26.3	20.7	29.8	19.5	71.9	55.4	128	115
A. Protrom.	92.6	7	92.6	7.2	92.9	8.2	69.7	15.3
GOT	25.2	6.6	23.7	6.7	26.3	6.6	87.6	48.9
GPT	24.9	9.3	20	4.8	26.7	10.5	46.5	30.6
GOT/GPT	0.99	0.27	1.26	0.4	1.31	0.38	1.63	0.8
F. Alc.	205	70.4	146	34.9	183	93	301	129
Bil. Total	0.73	0.15	0.76	0.13	0.73	0.2	2.21	1.7

TABLA I-b

	A1		A2		A3		B	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Prot. T.	73.1	5.31	70.9	6.97	74.26	7.2	72.6	10.9
Alb.	41	3.9	39.6	7.3	41.2	6.5	32.9	8.7
Alfa 1	2.22	0.5	2.12	0.94	2.4	0.81	2.31	0.76
Alfa 2	7.36	1.44	7.42	2.35	7.34	1.89	6.13	1.93
Beta	9.52	1.65	8.9	2.6	10.2	3.16	8.68	4.16
Gamma	12	2.32	12.4	4.96	13.1	3.71	21.8	7.06
IgG	1398	386	1298	438	1366	374	1975	1338
IgA	321	121	302	128	347	202	608	347
IgM	139	71	112	61	197	149	380	295
Leuco. T.	7575	2485	8252	1795	7480	1697	7026	2253
Neutrof.	4724	1316	5302	1954	4791	1428	4245	1957
Monocit.	477	120	488	149	473	179	529	187

TABLA I-c

	A1		A2		A3		B	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Linf. Tot.	2338	897	2232	755	1993	1022	2029	1366
Linf. B	134	78.4	133	53.2	136.2	72	112.2	64.6
Linf. T	1605	497	1546	481	1353	675	1491	868
OKT4	895	378	87.3	420	799	388	764	471
OKT8	644	259	710	320	475	203	517	349
T4/T8	1.43	0.4	1.27	0.43	1.7	0.48	1.71	0.36
PHA 0.05	70.7	40.1	63.3	40.7	32	20.5	51.9	23.6
PHA 0.1	72.9	46	66.5	36.2	30.8	17.5	53.8	27.9
PWM 0.05	55.9	32.1	59.3	31.7	28.8	16.9	52.2	21.8
PWM 0.1	54.1	29.4	55.7	27.8	28	18	48.4	21.6
Con A 0.05	51.7	32.2	51	22.6	32.9	16.6	52.9	21.7
Con A 0.1	53.4	31.8	50.7	20.8	29.1	14.1	50.4	23.6

TABLA II

Edad e Indice Corporal

		A1	A2	A3	B
Edad	M	52.6	53.7	45	55.2
	D.S.	18.3	15.6	14.1	12
	S.E.	N.S.	N.S.	N.S.	
I.Q.	M	24.7	25.6	24.7	25
	D.S.	2.6	3.5	3.9	2.4
	S.E.	N.S.	N.S.	N.S.	

TABLA III

Volumen Corpuscular Medio

	A1	A2	A3	B
M	87	95.1	96.3	99.7
DS	6.3	7	7.1	13

TABLA IV

Gamma GT

	A1	A2	A3	B
M	26.3	29.8	71.9	128
DS	20.7	19.5	55.4	115

TABLA V

Marcadores de Afectacion Hepatica

	A1-A2	A1-A3	A1-B	A2-A3	A2-B	A3-B
A. Protrombina	N.S.	N.S.	p<0.001	N.S.	p<0.001	p<0.001
G.O.T.	N.S.	N.S.	p<0.001	N.S.	p<0'001	p<0.001
G.P.T.	N.S.	N.S.	p<0.05	N.S.	p<0.01	p<0.05
F. Alcalina	N.S.	N.S.	p<0.01	N.S.	p<0.001	p<0.01
Bil. Total	N.S.	N.S.	p<0.001	N.S.	p<0.001	p<0.001
Prot. Totales	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Albumina	N.S.	N.S.	p<0.01	N.S.	p<0.05	p<0.01
Alfa 1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Alfa 2	N.S.	N.S.	p<0.05	N.S.	N.S.	N.S.
Beta	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Gamma	N.S.	N.S.	p<0.001	N.S.	p<0.001	p<0.001

TABLA VI

Cociente GOT/GPT

	A1	A2	A3	B
M	0.99	1.26	1.31	1.63
DS	0.27	0.4	0.38	0.8

TABLA VII

Leucocitos, Neutrofilos y Monocitos

	A1		A2		A3		B	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
LEUC	7575	2485	8252	1795	7480	1697	7026	2253
NEUT	4724	1316	5302	1954	4791	1428	4245	1957
MONO	477	120	488	149	473	179	529	187

TABLA VIII

Inmunoglobulinas

	A1		A2		A3		B	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
IgG	1398	386	1298	438	1366	374	1975	1338
IgA	321	121	302	128	347	202	608	347
IgM	139	71	112	61	197	149	380	295

TABLA IX

Linfocitos Totales

	A1	A2	A3	B
M	2338	2232	1993	2029
DS	897	755	1022	1366

TABLA X

Linfocitos B

	A1	A2	A3	B
M	134.9	133	136.2	112.2
DS	78.4	53.2	72	64.6

TABLA XI

Linfocitos T

	A1	A2	A3	B
M	1605	1546	1353	1491
DS	497	481	67	86

TABLA XII

Linfocitos OKT4

	A1	A2	A3	B
M	895	873	799	764
DS	378	420	388	471

TABLA XIII

Linfocitos OKT8

	A1	A2	A3	B
M	644	710	475	517
DS	259	320	203	499

TABLA XIV

Indice OKT4/OKT8

	A1	A2	A3	B
M	1.43	1.27	1.7	1.71
DS	0.4	0.43	0.48	0.36

TABLA XV

Test de Transformacion Linfoblastica

	A1		A2		A3		B	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
PHA1	70.7	40.1	63.3	40.7	32	20.5	51.9	23.6
PHA2	72.9	46	66.5	36.2	30.8	17.5	53.8	27.9
PWM1	55.9	32.1	59.3	31.7	28.8	16.9	52.2	21.8
PWM2	54.1	29.4	55.7	27.8	28	18	48.4	21.6
ComA1	51.7	32.2	51	22.6	32.9	16.6	52.9	21.7
ComA2	53.4	31.8	50.7	20.8	29.1	14.4	50.4	23.6

FIGURA XIII

Consumo de alcohol por Grupos

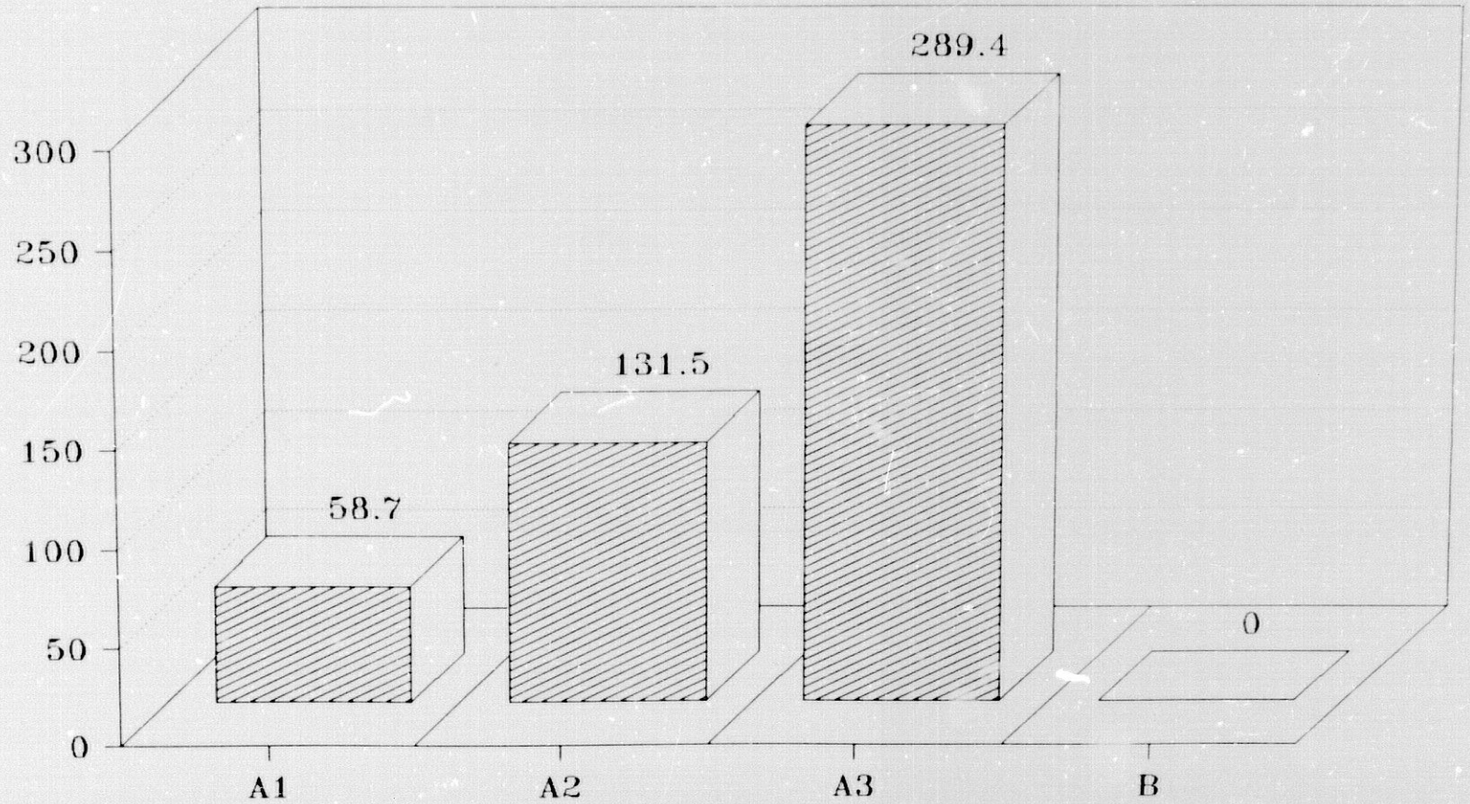


FIGURA XIV

VCM: Comparacion entre Grupos

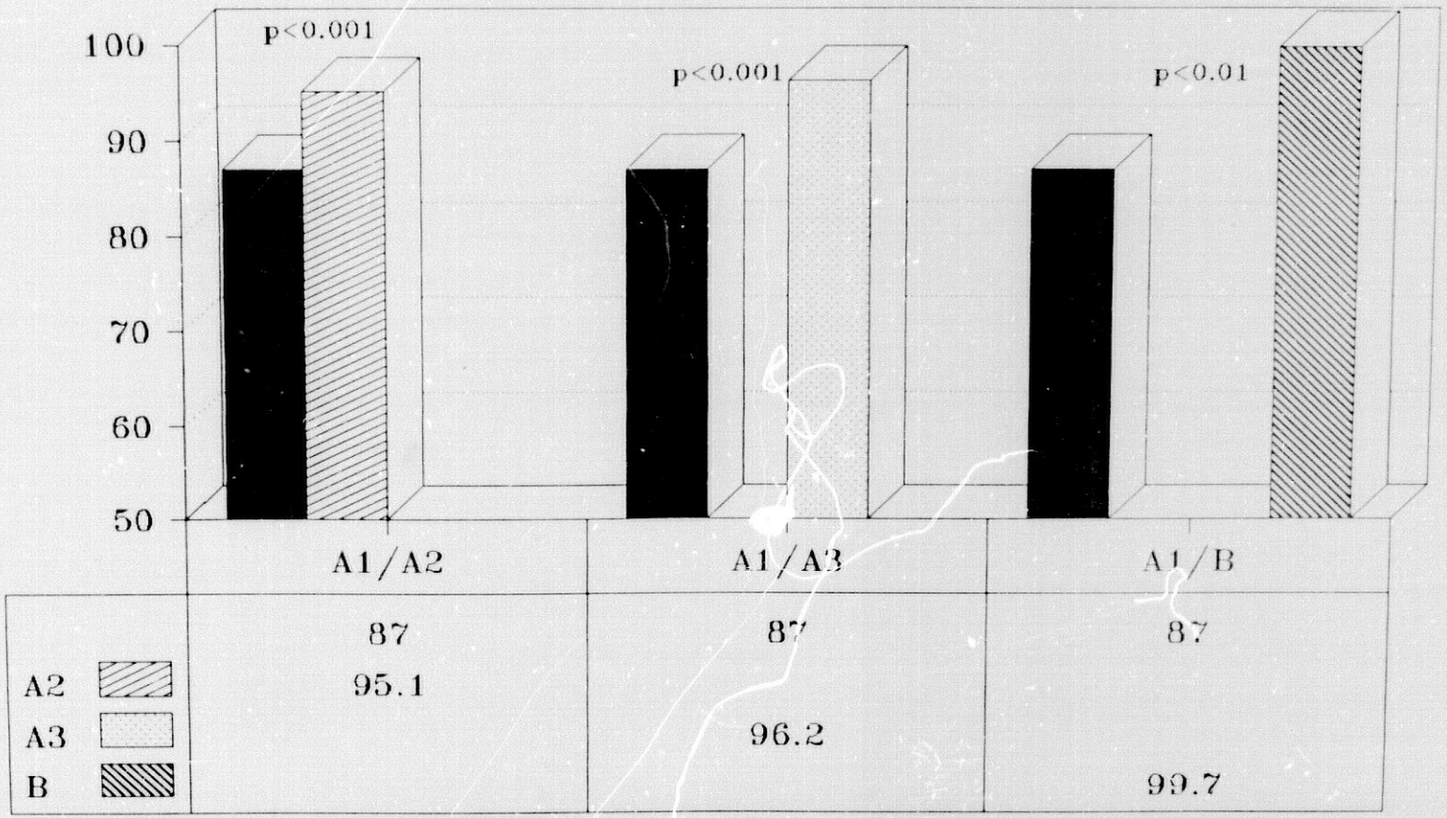
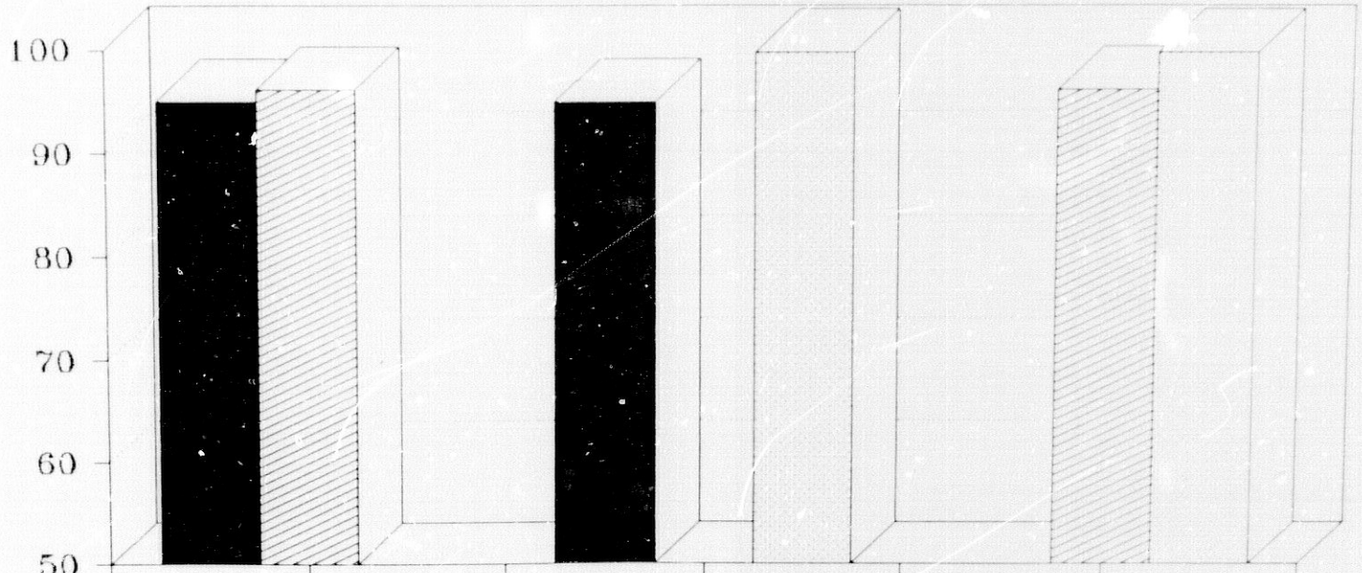


FIGURA XV

VCM: Comparacion entre Grupos



	A2/A3	A2/B	A3/B
A2	95.1	95.1	
A3	96.2		96.2
B		99.7	99.7

FIGURA XVI

GGT: Comparacion entre Grupos

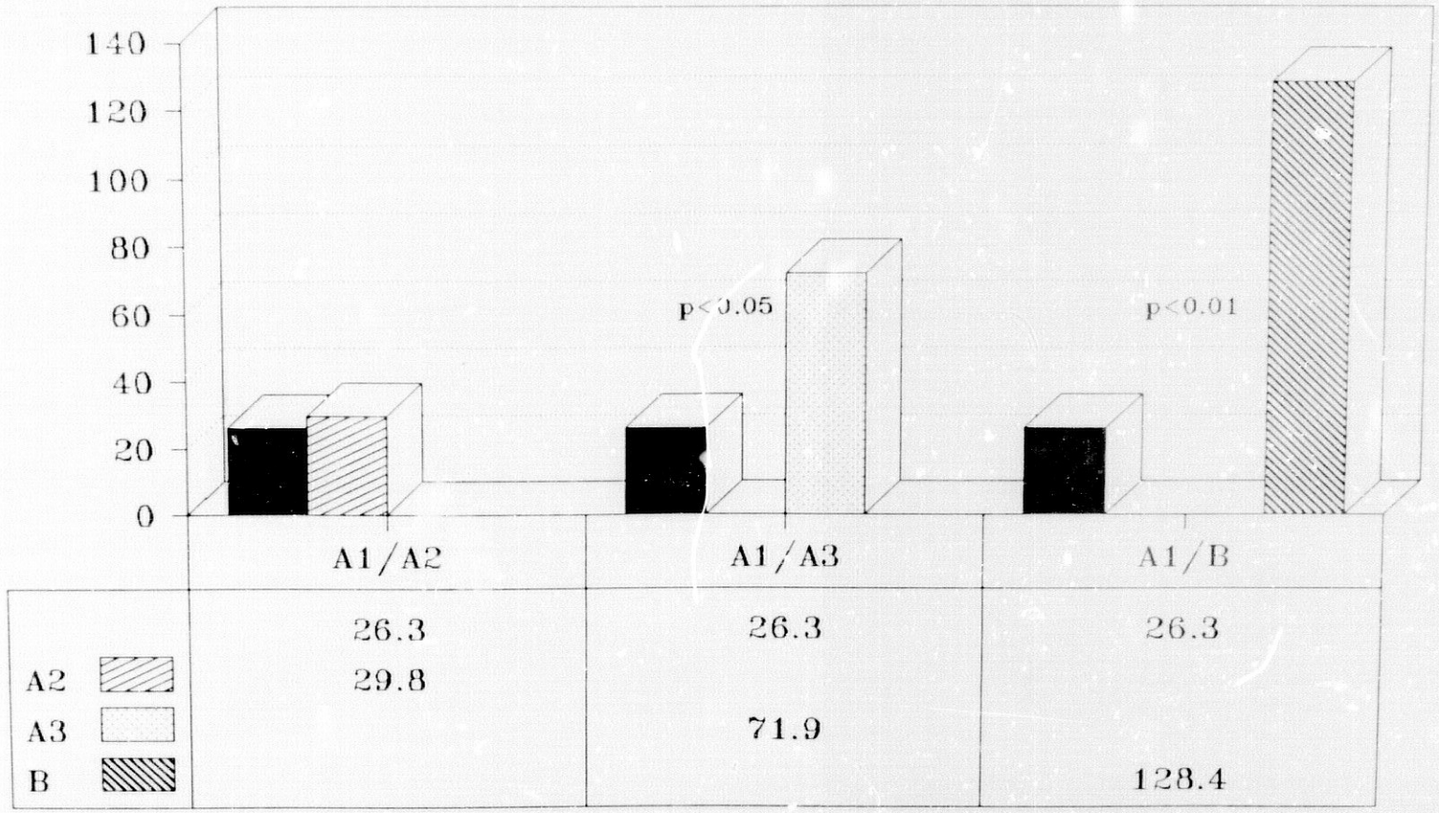
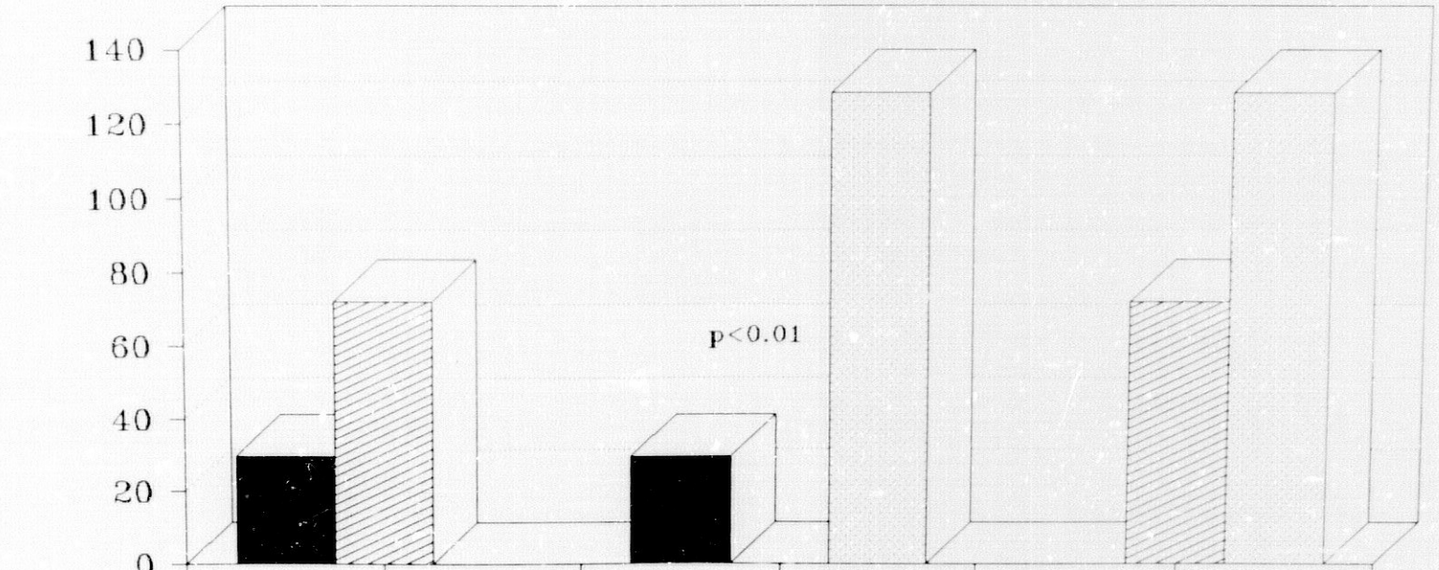


FIGURA XVII

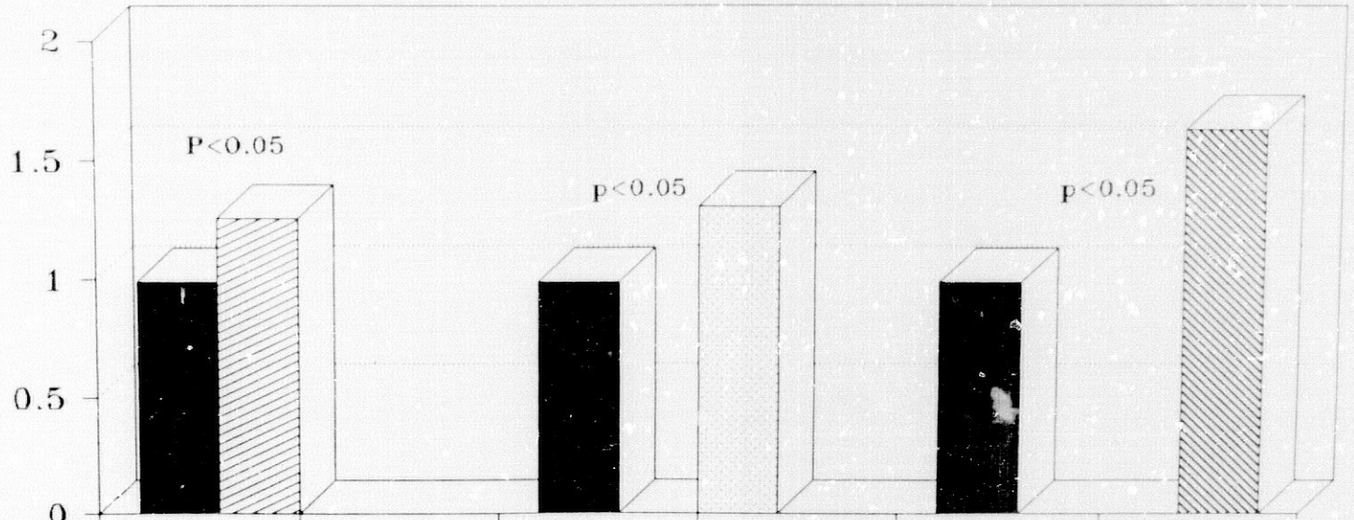
GGT: Comparacion entre Grupos



	A2/A3	A2/B	A3/B
A2	29.8	29 8	
A3	71.9		71.9
B		128.4	128.4

FIGURA XVIII

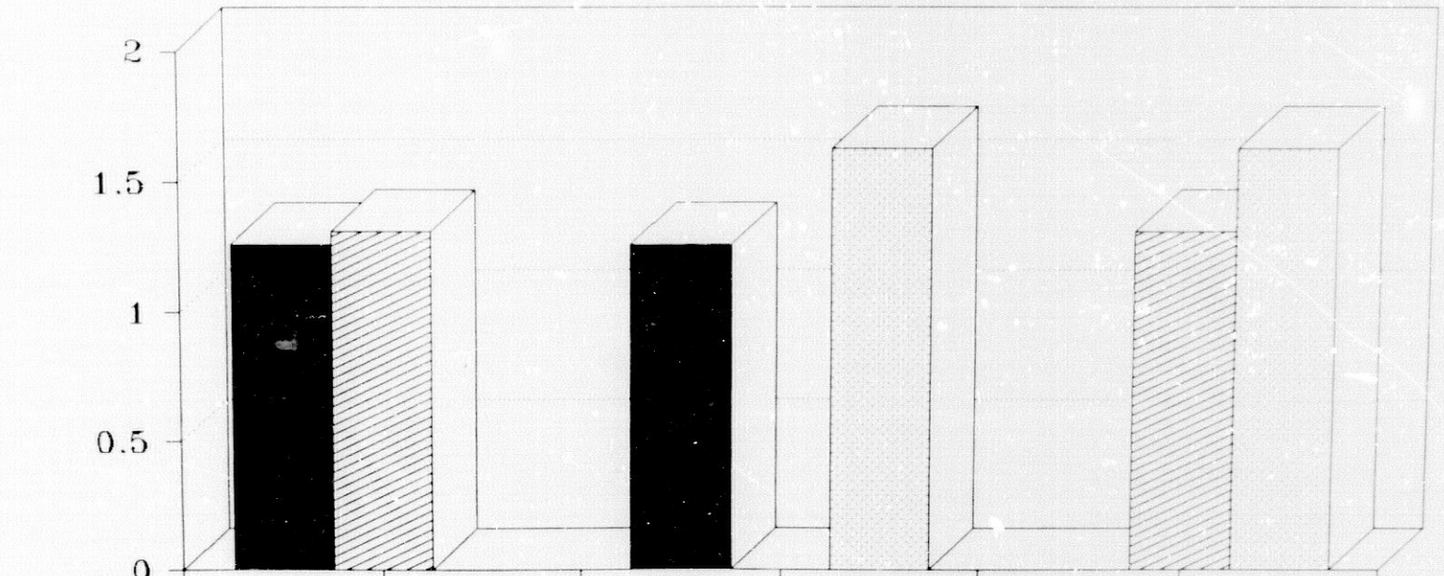
Indice GOT/GPT. Comparacion



	A1/A2	A1/A3	A1/B
	0.99	0.99	0.99
A2	1.26		
A3		1.31	
B			1.63

FIGURA XIX

Indice GOT/GPT. Comparacion



	A2/A3	A2/B	A3/B
A2	1.26	1.26	
A3	1.31		1.31
B		1.63	1.63

FIGURA XX

Leucocitos Totales

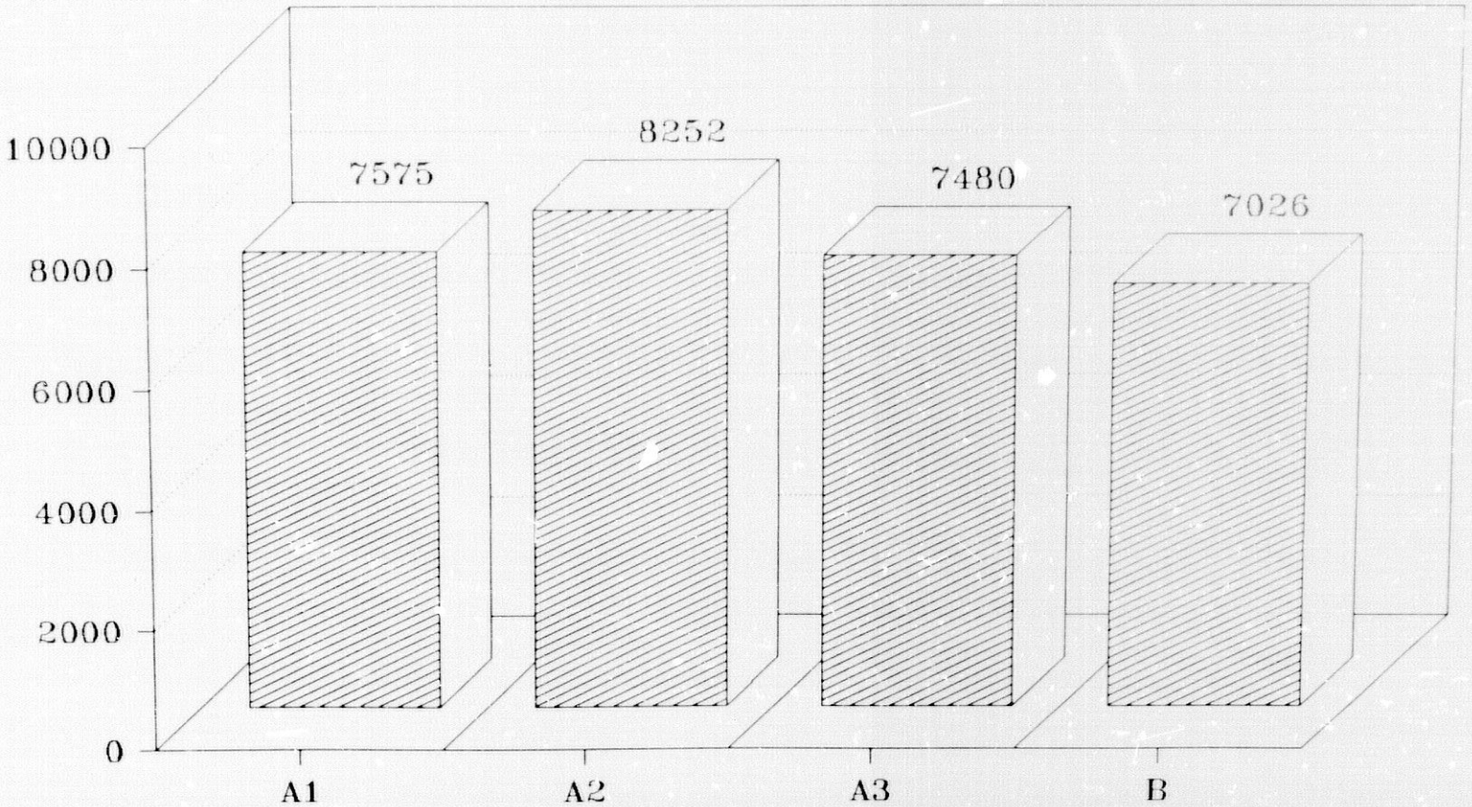


FIGURA XXI

Polinucleares Neutrofilos

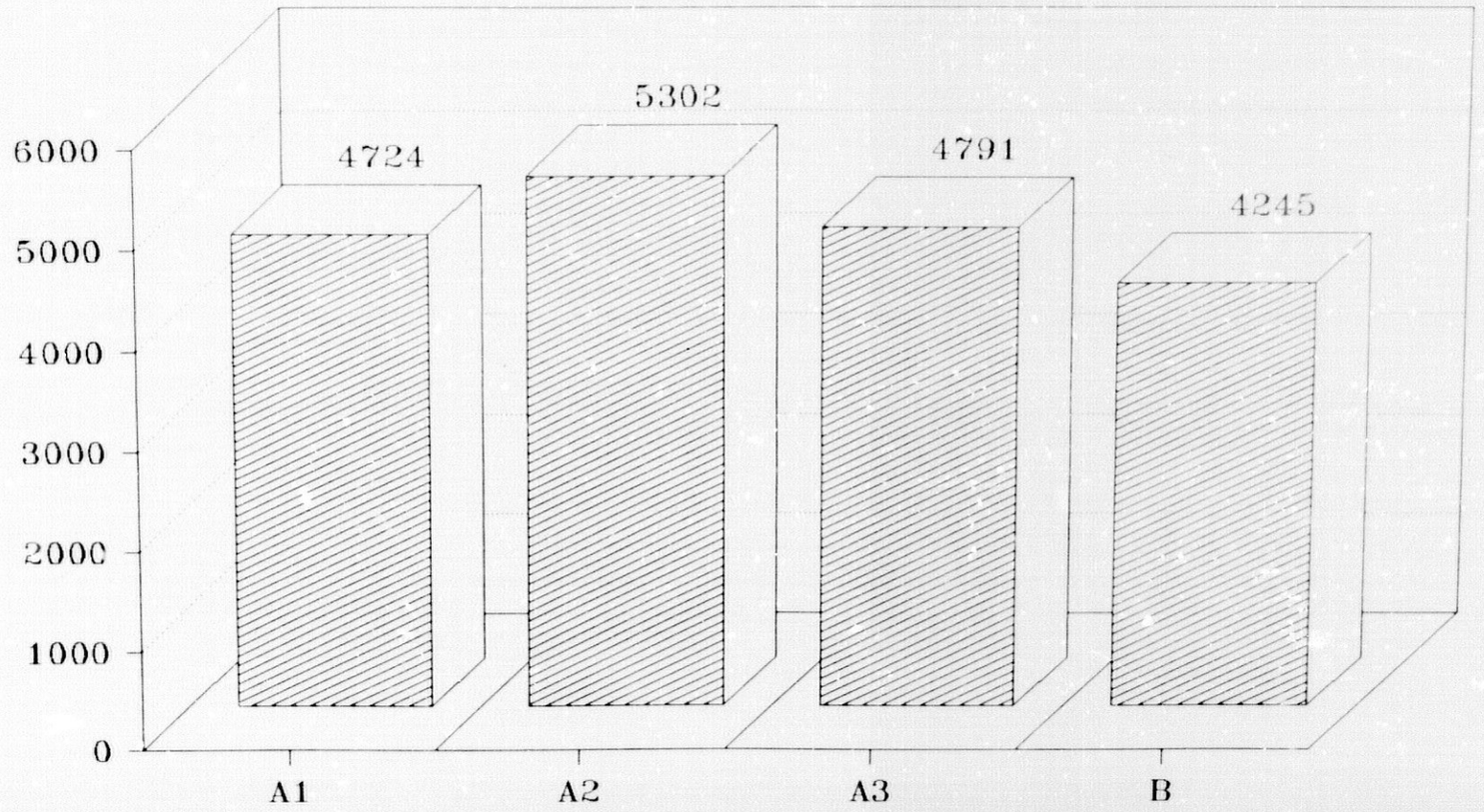


FIGURA XXII

Monocitos

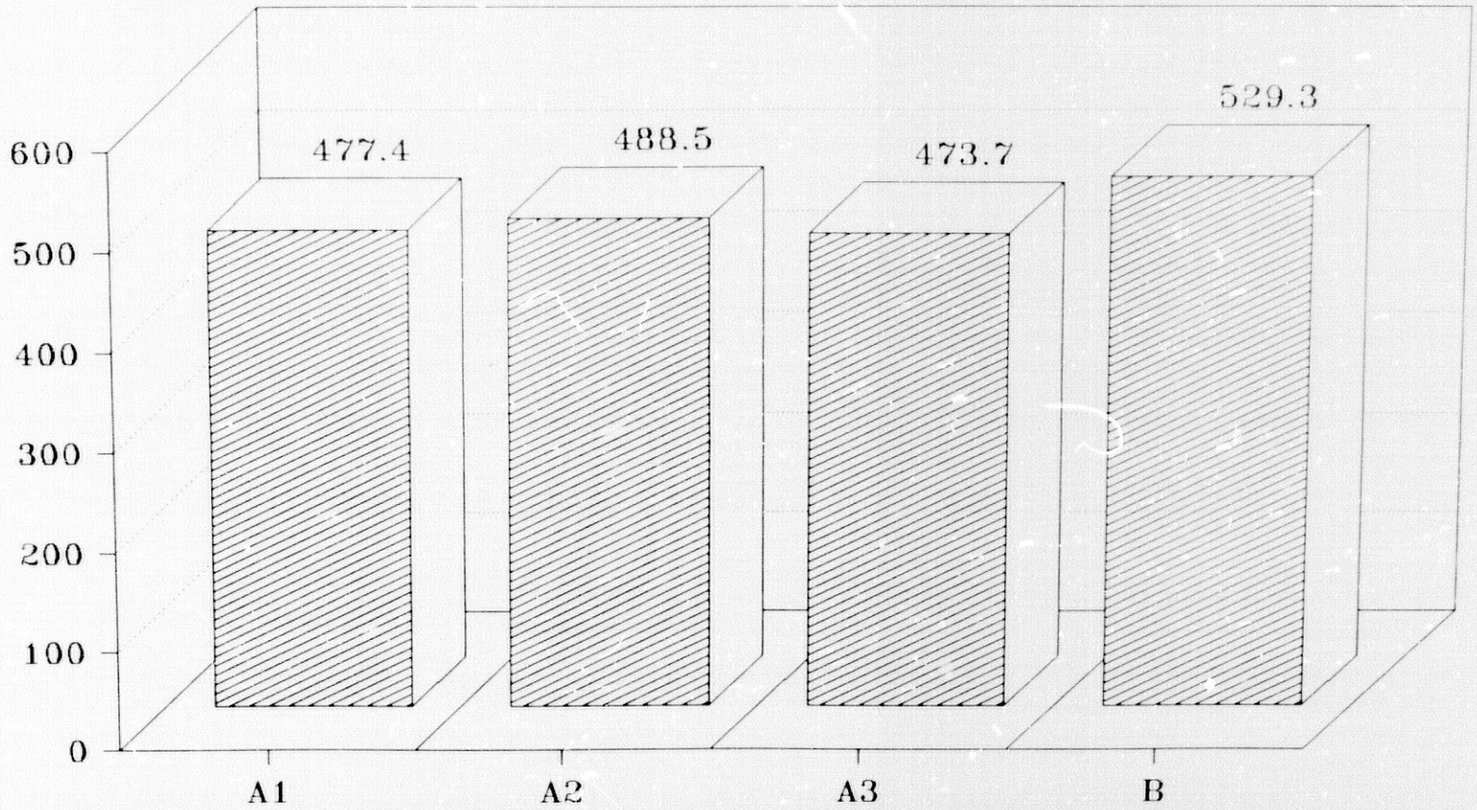


FIGURA XXIII

Inmunoglobulina G

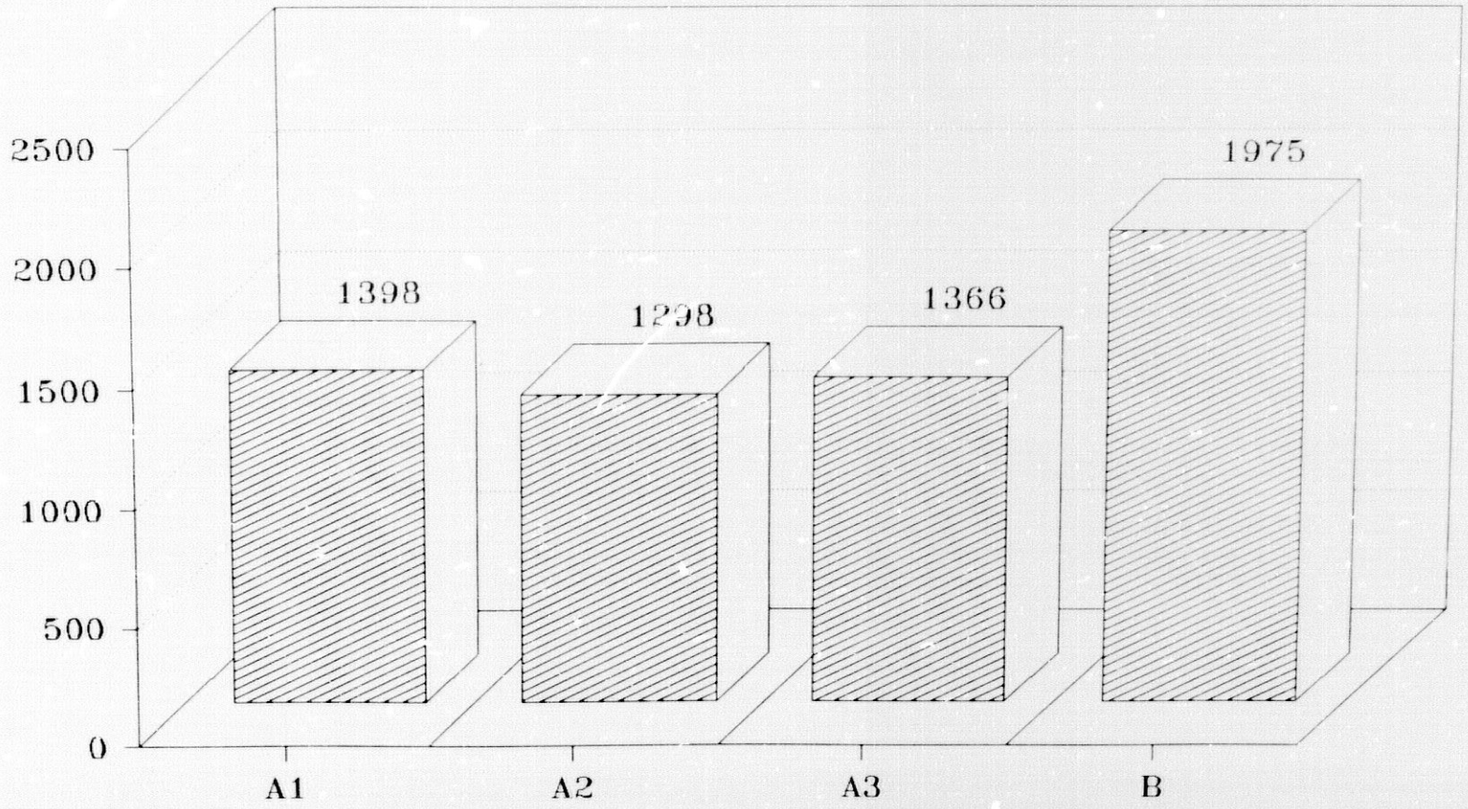


FIGURA XXIV

Inmunoglobulina A

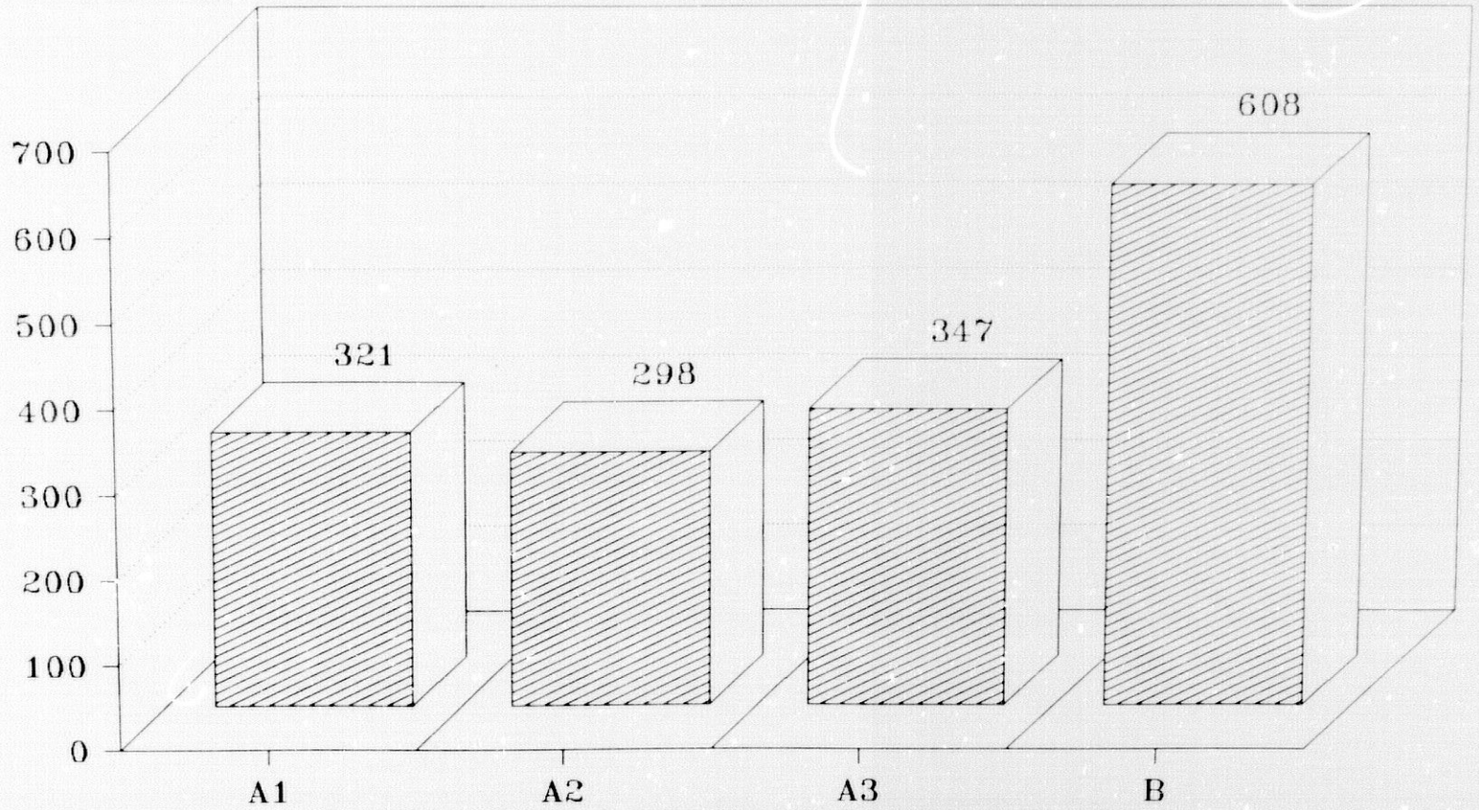


FIGURA XXV

Inmunoglobulina M

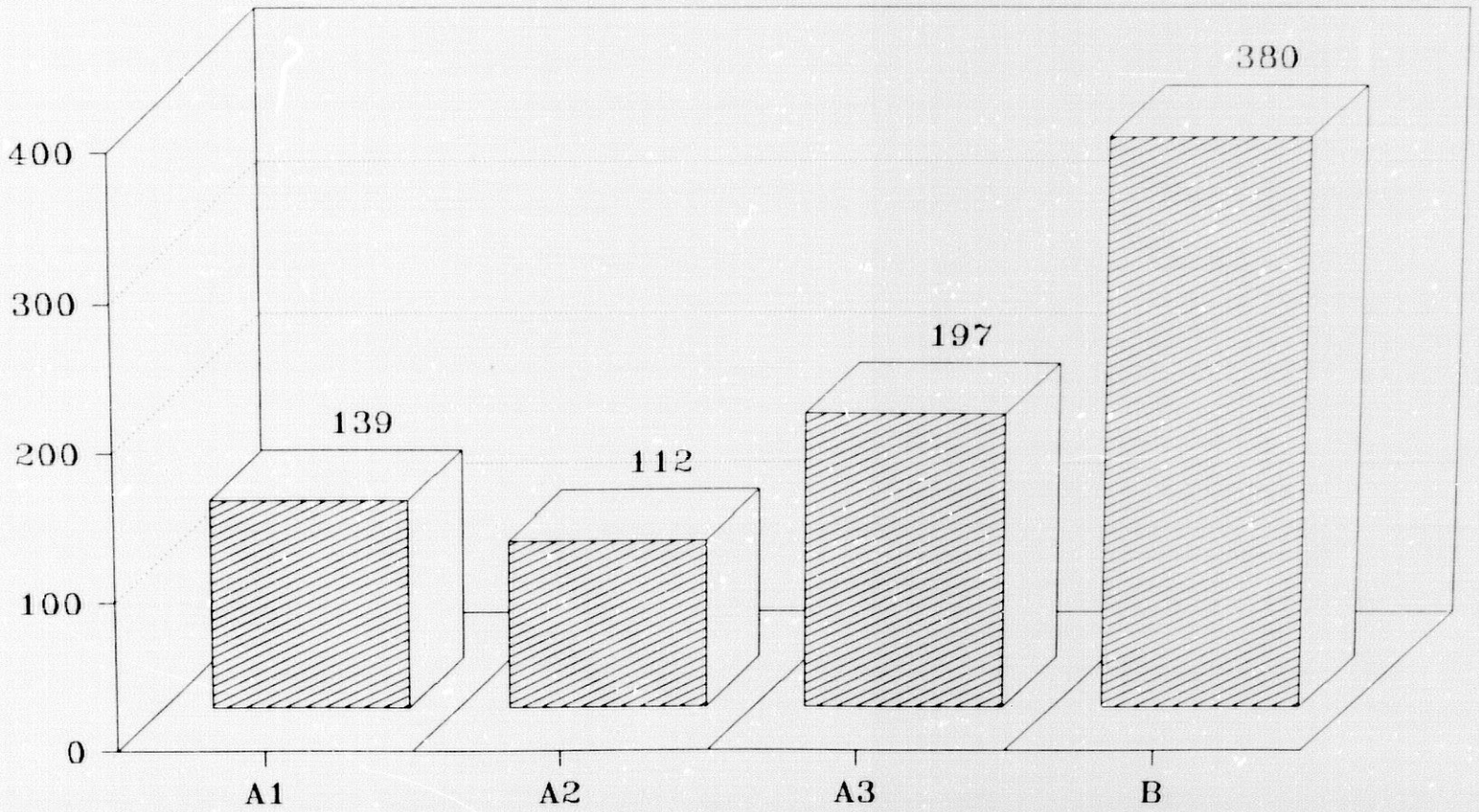


FIGURA XXVI

Linfocitos Totales

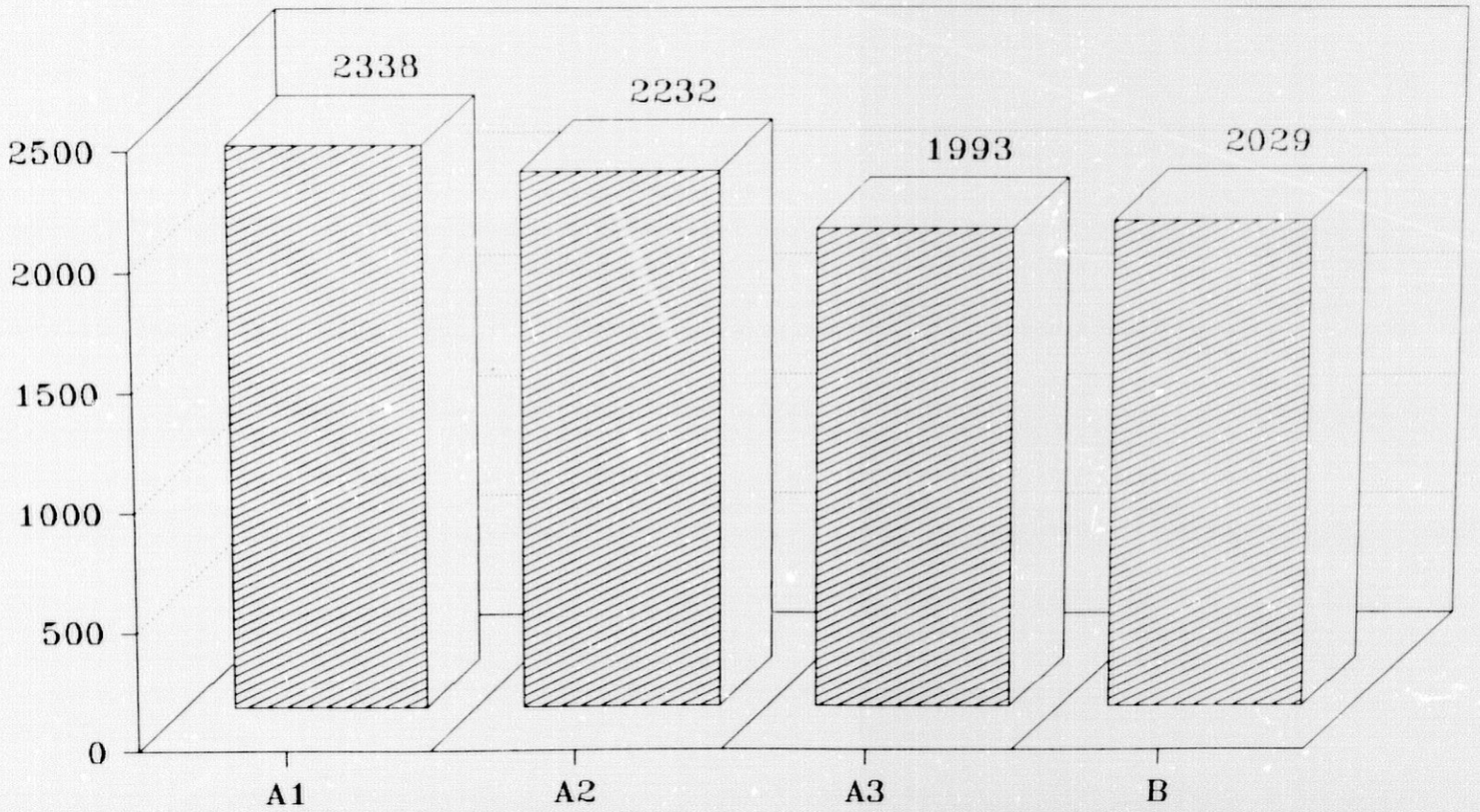


FIGURA XXVII

Linfocitos B

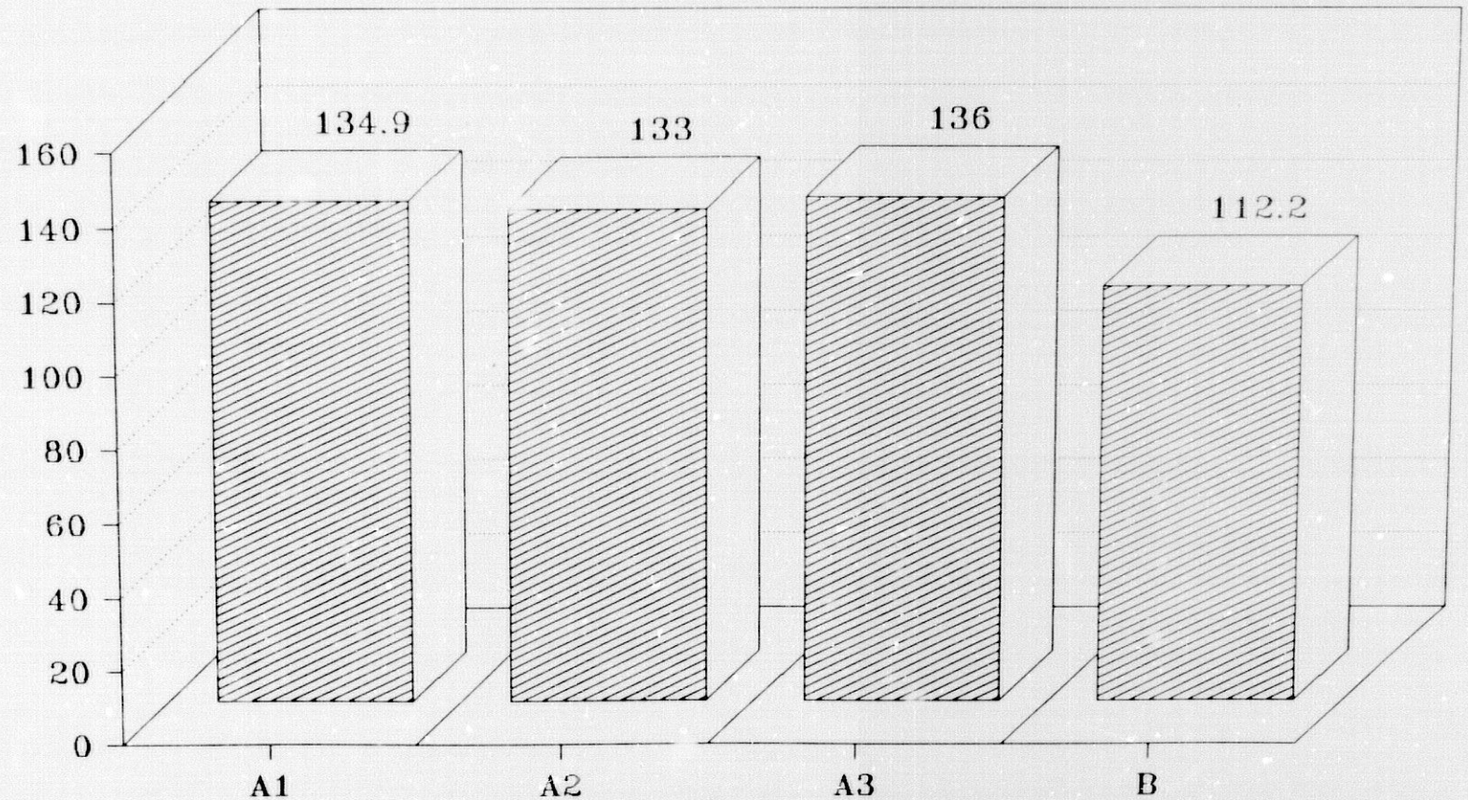


FIGURA XXVIII

Linfocitos T

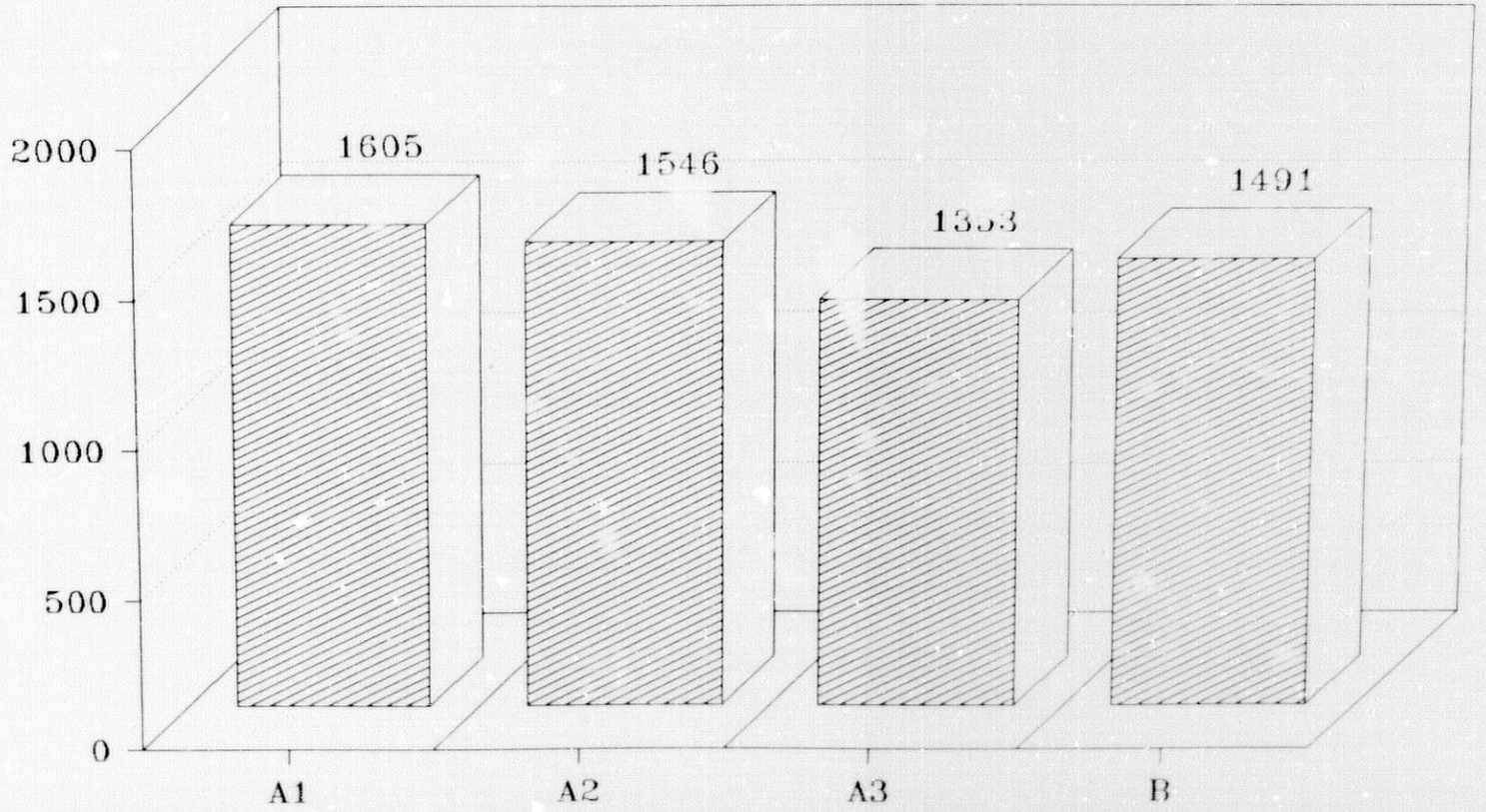


FIGURA XXIX

Linfocitos OKT4

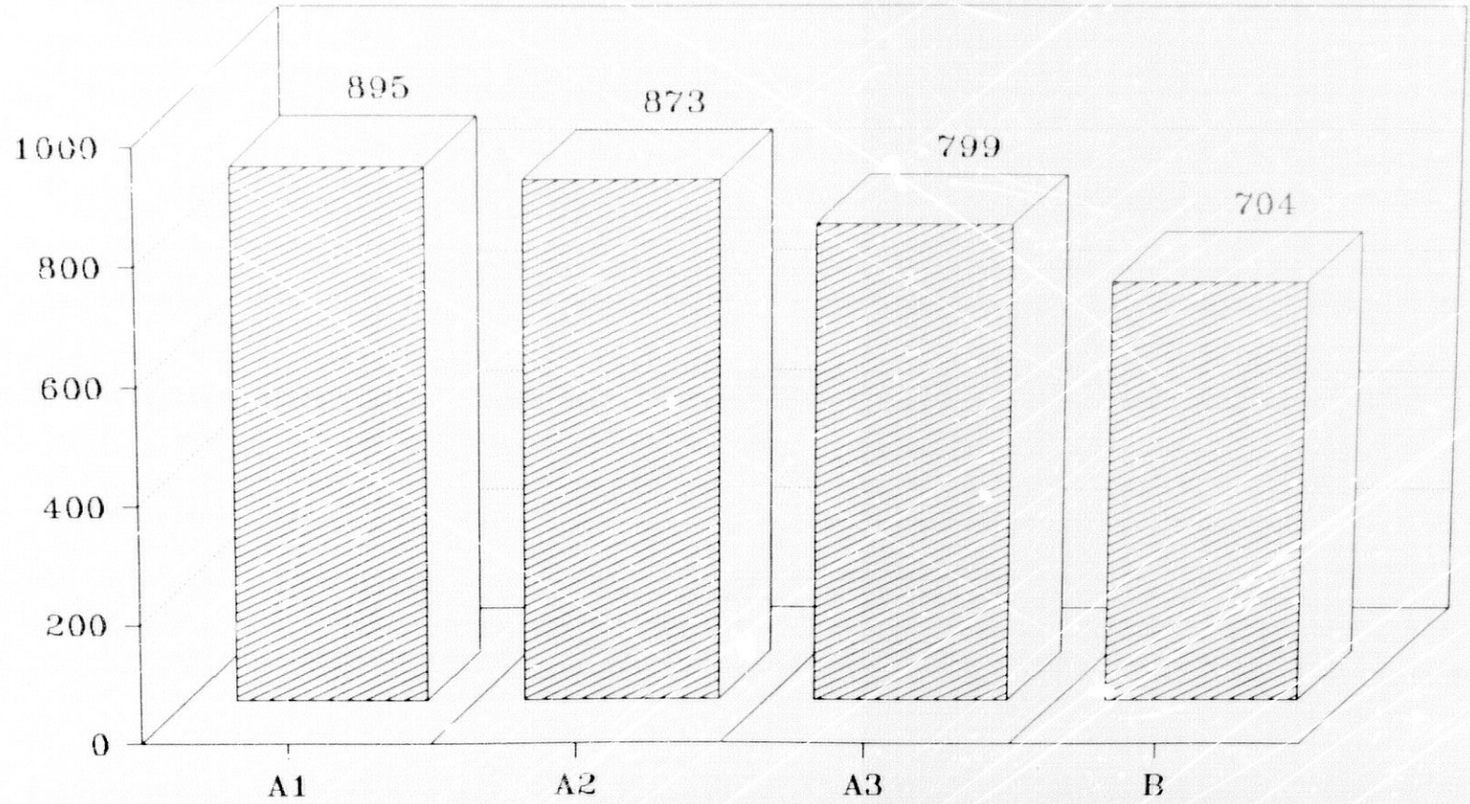


FIGURA XXX
Linfocitos OKT8

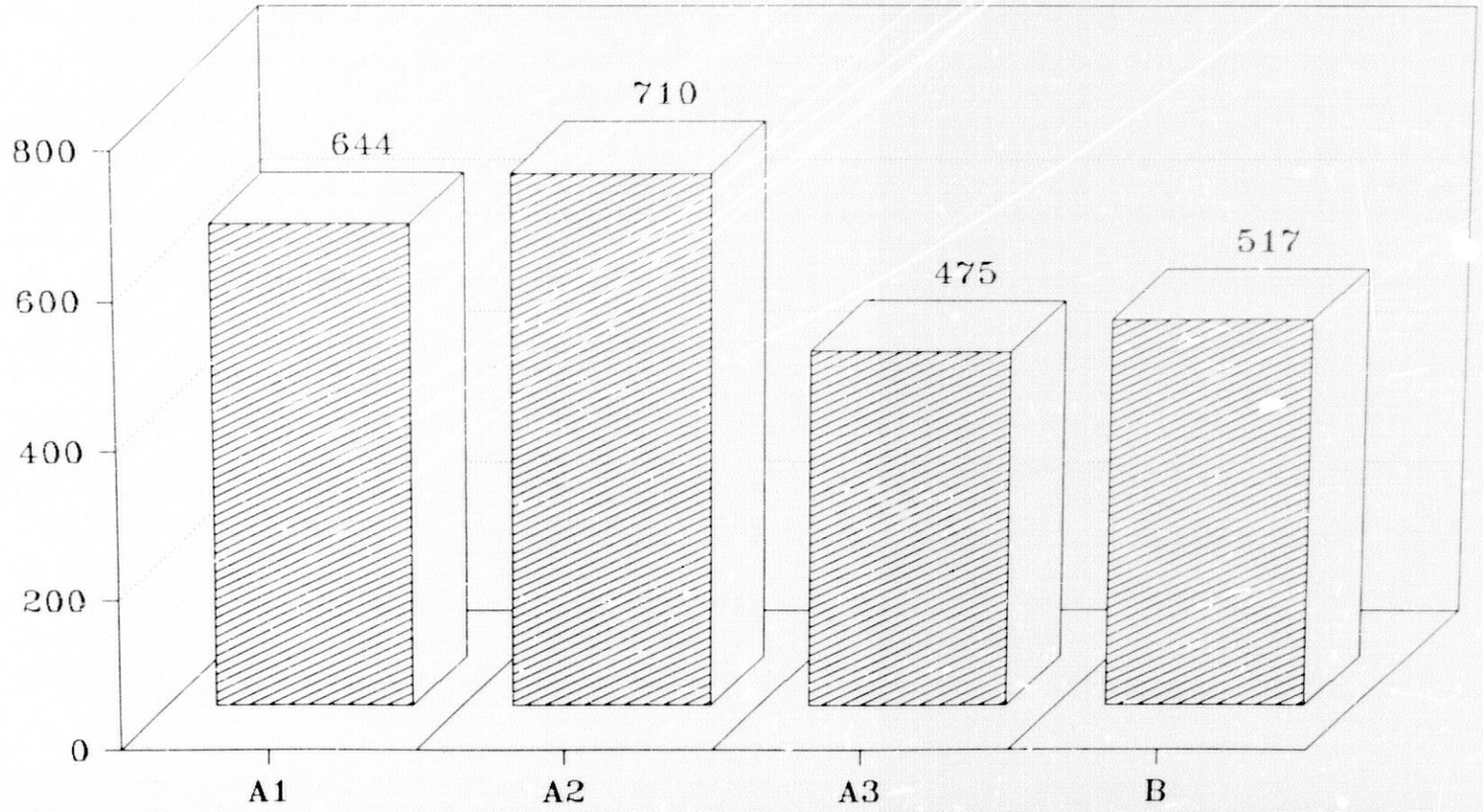


FIGURA XXXI

Linfocitos OKT8. Comparacion

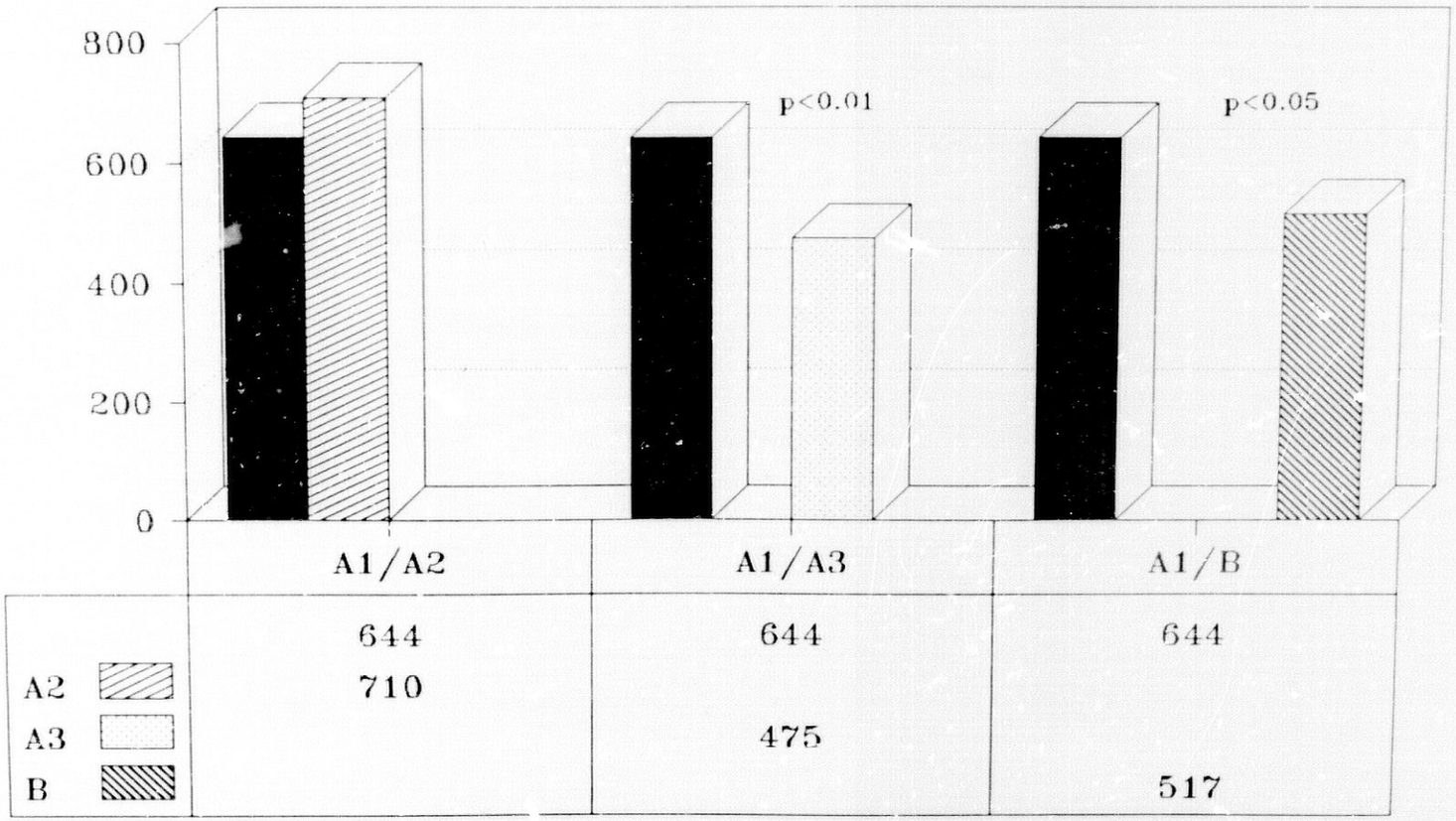
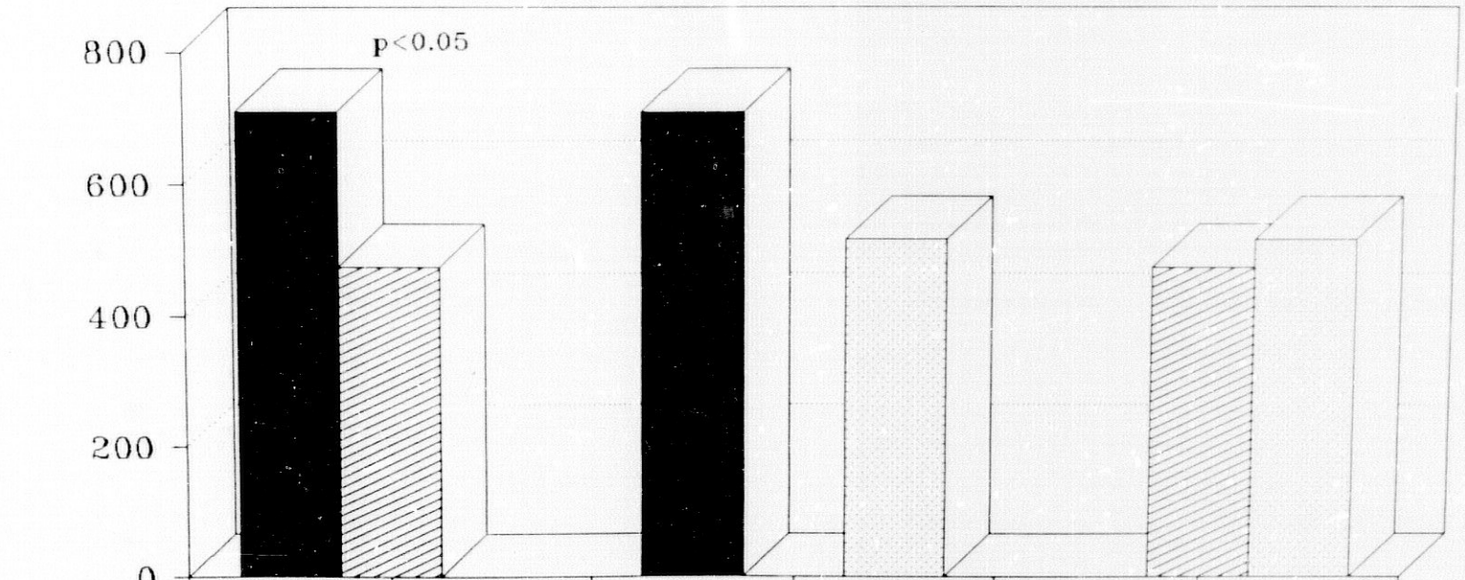


FIGURA XXXII

Linfocitos OKT8. Comparacion



	A2/A3	A2/B	A3/B
A2	710	710	
A3	475		475
B		517	517

FIGURA XXXIII

Indice OKT4/OKT8

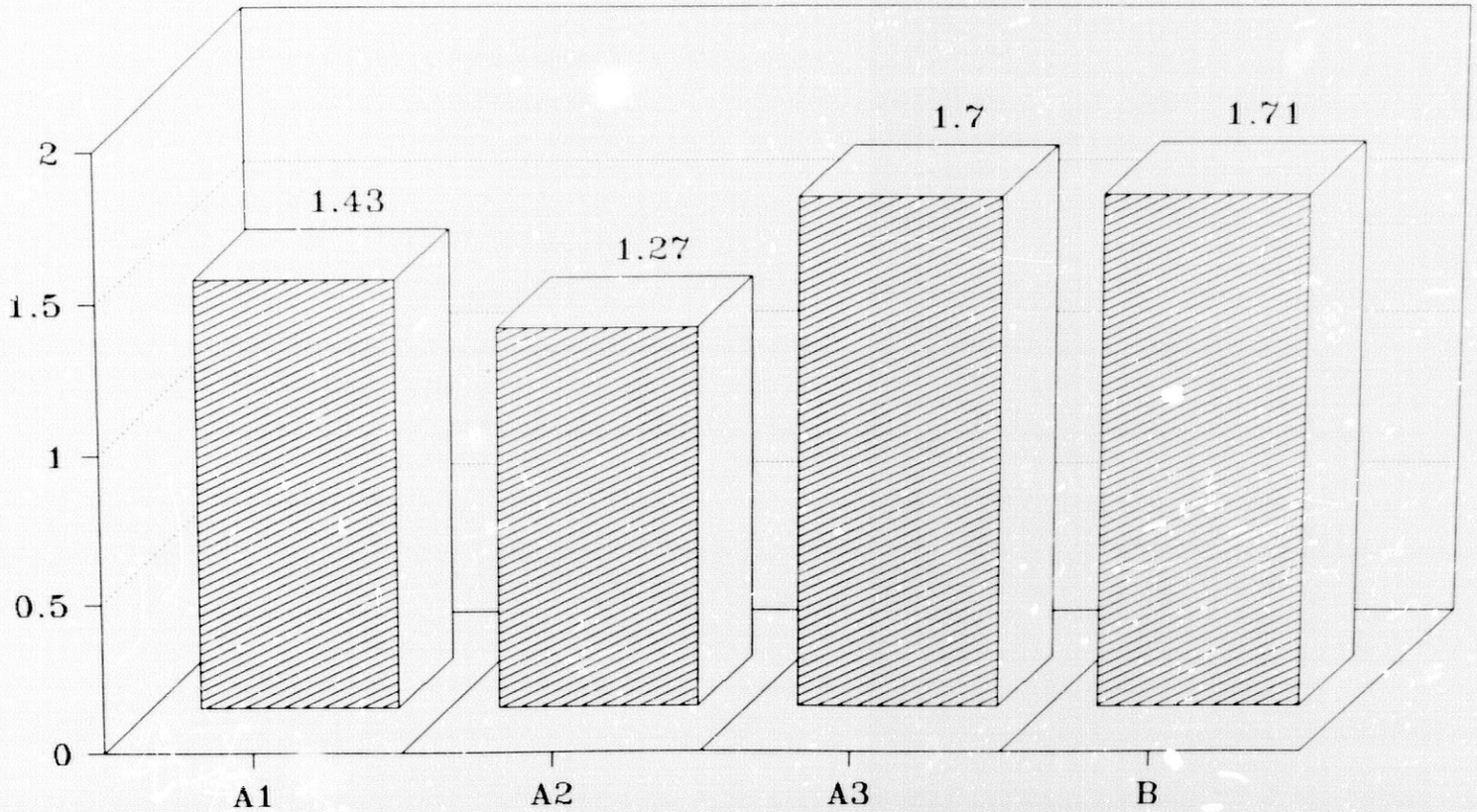


FIGURA XXXIV

Indice OKT4/OKT8. Comparacion

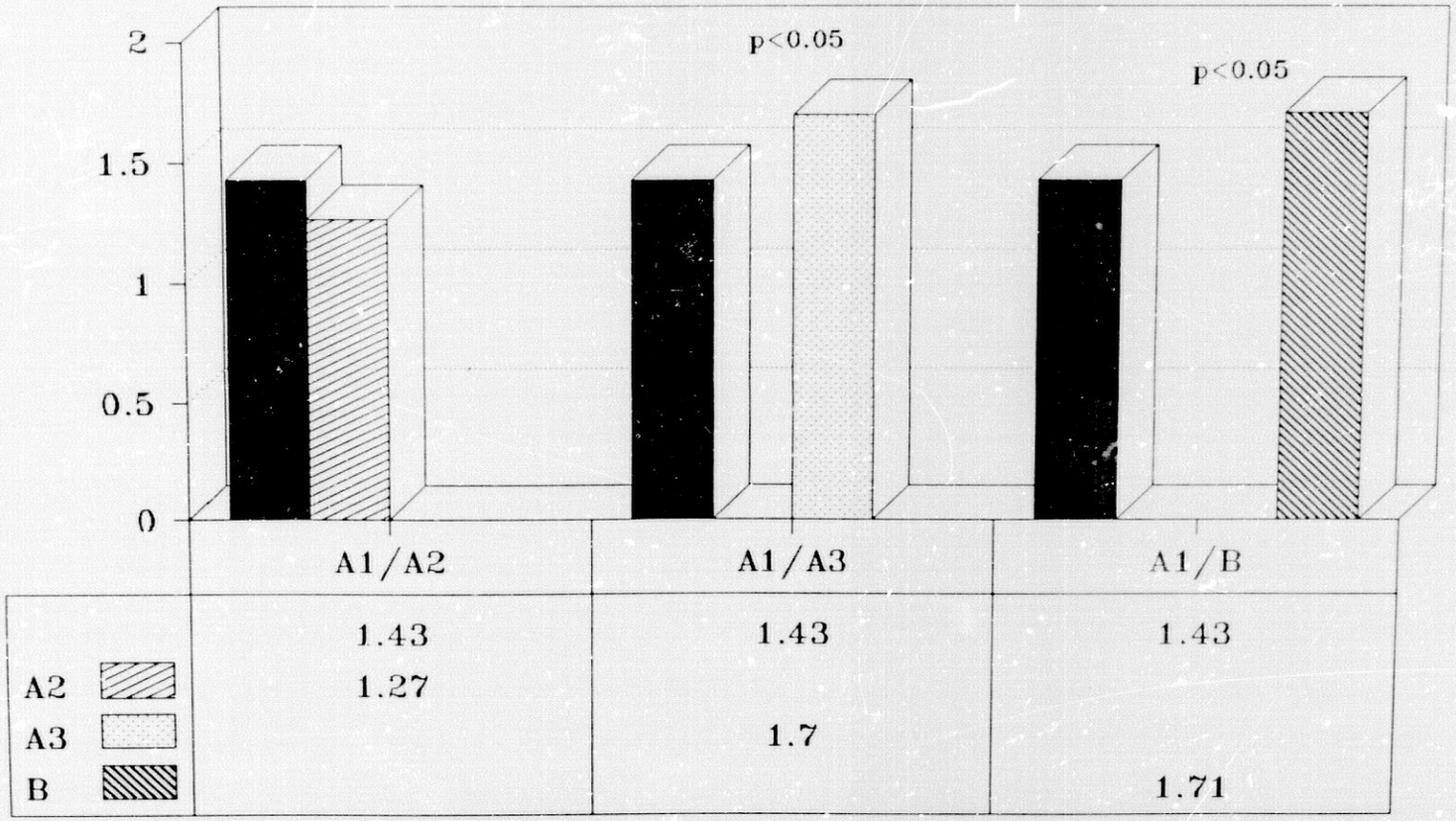


FIGURA XXXV

Linfocitos OKT4/OKT8. Comparacion

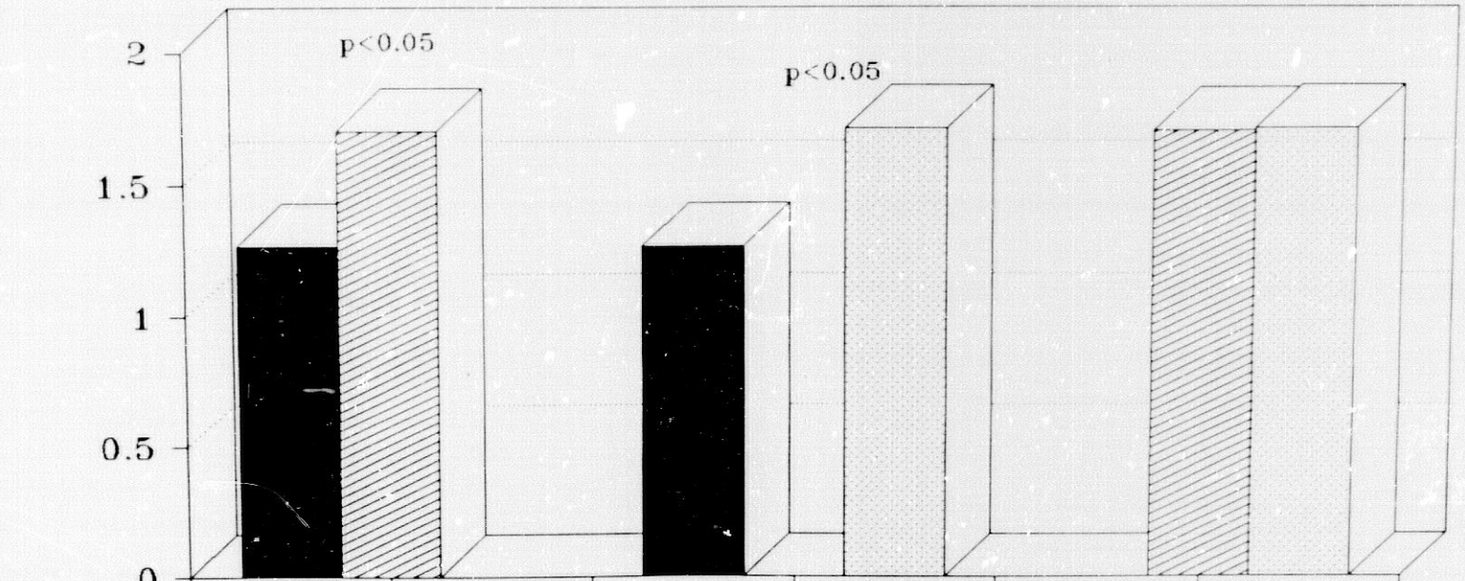
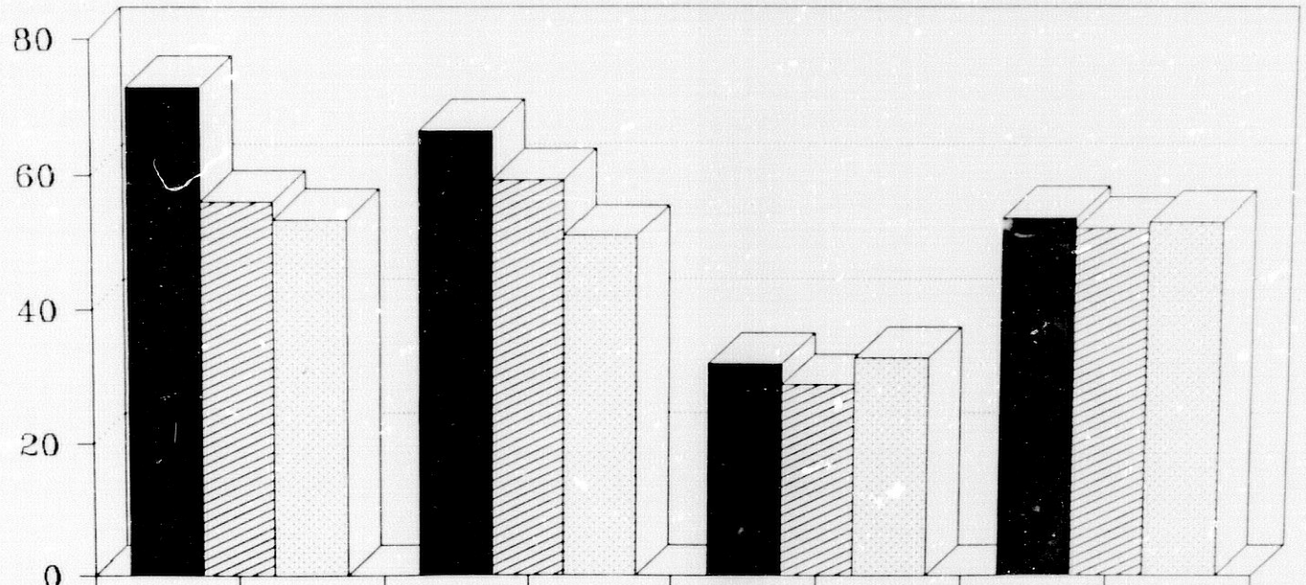


FIGURA XXXVI

Transformacion Linfoblastica



	A1	A2	A3	B
PHA	73	66.5	32	53.8
PWM	56	59.3	28.8	52.2
Con A	53.4	51	32.9	53

CAPITULO VII

DISCUSION

Nuestro estudio se ha llevado a cabo sobre una muestra de 73 personas con distinto grado de hábito alcohólico, de las que 58 tienen un hígado sano y 15 son cirróticos en estadio A de la clasificación de Child. En el primer grupo están incluidos 23 individuos bebedores sociales en los que la cantidad de alcohol ingerida diariamente no produce repercusión orgánica según se ha demostrado en la literatura y por tanto sirven como control. Hay también en este primer grupo 14 individuos sanos que constituyen el grupo A2, cuya ingesta alcohólica oscila entre 80 y 160 g. diarios, cantidad suficiente para producir daño hepático, que se han incluido en el estudio para ver si estas dosis cotidianas de alcohol puede producir algún tipo de alteración inmunitaria.

Los 21 sujetos restantes de este primer grupo son personas que consumen mas de 160 g. diarios de alcohol etílico y tienen un riesgo elevado de sufrir una lesión orgánica inducida por el alcohol.

Hemos incluido 15 cirróticos en el estudio para ver si las alteraciones inmunitarias que se pudieran encontrar en relación con el consumo de alcohol son las mismas o diferentes de las descritas en los cirróticos y poder extraer consecuencias etiopatogénicas.

La finalidad del estudio es ver si se producen alteraciones de la inmunidad humoral o celular en re-

lación con la cantidad de etanol consumido y si estas alteraciones aparecen antes de que se desarrolle una hepatopatía, pudiendo de esta forma considerar al alcohol el causante de ellas y no la hepatopatía.

La investigación de la inmunidad humoral la hemos realizado mediante la cuantificación de linfocitos B y de Inmunoglobulinas Ig G, Ig A e Ig M. La investigación de la inmunidad celular se ha efectuado mediante la determinación de linfocitos T, subpoblaciones OKT4, OKT8 e índice OKT4/OKT8.

Además hemos explorado el estado funcional de los linfocitos mediante su estimulación con mitógenos inespecíficos y cuantificando la respuesta proliferativa, ya que con este procedimiento se pueden poner de manifiesto alteraciones inmunitarias de tipo funcional que no se han descrito hasta ahora.

Se han cuantificado tambien los leucocitos totales, polimorfonucleares neutrófilos y monocitos ya que son células fagocíticas que participan en el sistema inmune.

Hemos completado el estudio con la determinación de los marcadores de alcoholismo y de afectación hepática para ver si existia alguna diferencia en la cantidad de alconol necesaria para afectar al hígado, sistema hematopoyetico y sistema inmune y poder utilizarlos como comparación.

En esta discusión haremos en primer lugar algunos

comentarios sobre la metodología seguida y posteriormente una valoración de los resultados encontrados en nuestra investigación clínica.

7.1.-MATERIAL Y METODOS

Los estudios realizados acerca de la repercusión orgánica del alcoholismo crónico plantean una serie de problemas en cuarto a establecer una relación entre las alteraciones encontradas y la cantidad de alcohol ingerido. El primero es que nunca está seguro el investigador del alcohol consumido realmente por el sujeto independientemente de la cantidad que declare; el ideal para evitar esto es planificar un estudio prospectivo doble ciego y randomizado administrando una cantidad determinada de alcohol a un grupo y un placebo a otro siendo desconocidos ambos grupos para el investigador; de esta manera estaríamos seguros de la cantidad de alcohol ya que para conocer el efecto crónico se precisaría cantidades excesivas de alcohol durante mucho tiempo con riesgo para los individuos que participasen en el estudio, lo que plantearía serios problemas deontológicos. Podría salvarse este inconveniente llevando a cabo el estudio en animales de experimentación pero los resultados obtenidos no siempre son extrapolables a seres humanos.

En investigación clínica nos vemos obligados a plantear los estudios basados en una encuesta lo mas completa posible para conocer la ingesta de bebidas alcohólicas y posteriormente transformar esta cantidad en gramos de alcohol puro, así como tambien el tiempo de consumo, tal y como se ha hecho en el presente es-

tudio. En este tipo de encuestas se corre el riesgo de que la ingesta declarada por el individuo sea inferior a la real ya que la mayor parte de los sujetos tratan de ocultar o minimizar su hábito etílico.[139] Este posible error se corrige agrupando a los sujetos del estudio según la ingesta declarada en grupos con intervalos de ingesta relativamente amplios, como se hace en este estudio y en la mayoria (en nuestro caso menos de 80 g., de 80 a 160 g y más de 160 g). De esta manera estamos seguros que los individuos están incluidos en el grupo que previamente hemos determinado.

Otro dilema que se plantea es excluir o nó a las mujeres del estudio. En general, las mujeres ocultan más el hábito alcohólico que los hombres ya que en el sexo femenino tiene peor consideración social que entre el masculino. Encuestas de prevalencia del alcoholismo entre sexos muestran una amplia variabilidad en los resultados, desde una relación hombre a mujer de 3/1 en algunas encuestas, a otras que muestran una relación 1.5/1 y todo ello motivado por razones socioculturales fundamentalmente.[44] En el ámbito rural se oculta con mayor celo el accholismo femenino mientras que en grandes ciudades y ambientes urbanos se va aceptando y reconociendo progresivamente con mayor facilidad, quizás influido porque mujeres de gran relevancia social van aceptando públicamente su toxicomanía. Por otra parte es muy probable que entre aque-

llas mujeres que reconocen beber con moderación haya una alta incidencia de alcohólicas.[100] Por estos motivos, estudios clásicos sobre alcoholismo que se basan en encuestas alcohólicas se han realizado en hombres solamente y excluyen a las mujeres.[30,185]

Dado que nuestro estudio se ha realizado en una comunidad predominantemente rural, para evitar el riesgo de error y siguiendo a los trabajos citados, hemos excluido a las mujeres.

Por último, queremos hacer algunos comentarios acerca del procedimiento seguido para descartar hepatopatía. El diagnóstico de cirrosis hepática es siempre histológico; por ello hemos realizado biopsia hepática a todos aquellos pacientes que presentaban alteración de algún parámetro que pudiese sugerir hepatopatía (actividad de protrombina, GOT, GPT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, hipergammaglobulinemia) o que tuviesen algún estigma o signo clínico de hepatopatía. Con estos criterios se han realizado un total de 29 biopsias hepáticas; se han encontrado en ellas 4 casos de cirrosis hepática que se han excluido del estudio ya que eran bebedores activos, 3 casos de esteatosis hepática y 3 casos de fibrosis hepática que quedaron tambien excluidos del estudio. A 5 pacientes no se les pudo realizar biopsia hepática por existir contraindicación y tambien se excluyeron.

Queda latente siempre la posibilidad de una ci-

rrosis hepática no sospechada. La incidencia de cirrosis hepática en necropsias es de 2-4%. Para descartar esta posibilidad hubiese sido necesario hacer una punción biopsia hepática a todos los sujetos. Aunque esta es una exploración relativamente inocua, es agresiva, precisa hospitalización durante un periodo de 24 horas y tiene riesgo de complicaciones graves por lo que resulta dificil justificarla en ausencia de una indicación clínica evidente. De todos modos, el número total de pacientes que forman partes del estudio y que no tienen biopsia hepática es de 44. Ninguno de ellos tenía signos clínicos de hepatopatía ni alteración de ningun parámetro bioquímico; de acuerdo con la incidencia encontrada en necropsias, cabría esperar entre ellos 1 ó 2 casos de hepatopatía insospechada que no puede tener significación a la hora de estudiar los resultados y cuyo descubrimiento mediante biopsia hepática sistemática no muestra una razón riesgo-beneficio favorable.

7.2.-MARCADORES DE ALCOHOLISMO.

7.2.1.-Volumen corpuscular medio (V.C.M.).

Nuestro estudio muestra un aumento del VCM en los pacientes de los grupos A2 (95+/-7), A3 (96.28+/-7.16) y B (99.73+/-13.06) en relación con el VCM del grupo A1 (87+/-6.27 micras^3) que resulta altamente significativo ($p<0,001$). En cambio no hay significación estadistica cuando se comparan los grupos A2 A3 y B entre si.

Estos resultados están de acuerdo con lo descrito en la literatura,[11,79,134,185] pero además nos permite hacer las siguientes consideraciones:

a): El VCM es un marcador sensible de alcoholismo y aumenta cuando la ingesta alcohólica sobrepasa los 80 g. diarios.

b): El consumo de una cantidad mayor de alcohol no aumenta de una manera proporcional el VCM, por lo que no podemos considerarlo como un marcador cuantitativo.

c): Los pacientes cirróticos de origen alcohólico muestan un VCM algo mayor que el resto de los grupos pero sin alcanzar diferencias significativas por lo que podemos considerar el alcohol y no la hepatopatía el principal responsable del aumento del VCM.

7.2.2.-Gammaglutamil transpeptidasa (GGT).

En nuestro estudio encontramos un aumento progresivo de la GGT (26.3, 29.8, 71.9 y 128.4 U.I./ml) para

los grupos A1, A2, A3 y B respectivamente. Este aumento no es significativo entre el grupo A1 y A2, es decir, entre los que beben menos de 80 y de 80 a 160 g. de alcohol/día, pero si es significativo entre los que beben mas de 160 y menos de 160 g. de alcohol/día. Los cirróticos presentan el aumento mayor de GGT; este aumento es significativo con respecto a los grupos A1 y A2 pero no lo es cuando se compara con el grupo A3 a pesar de que los valores son considerablemente mas altos. Esto se debe a que los cirróticos tienen una gran dispersión de valores de GGT.

Nuestros resultados nos permiten afirmar:

a): La GGT es un marcador de alcoholismo que se afecta mas tardiamente que el VCM ya que precisa un mayor consumo de alcohol para afectarse.

b): El aumento de GGT es proporcional a la cantidad de alcohol ingerido.

c): Los pacientes con cirrosis hepática muestran los valores mas altos de GGT.

Estos resultados coinciden con los de otros autores[30] que encuentran un aumento constante de la GGT en pacientes alcohólicos sin hepatopatía; este aumento suele desaparecer a las 4 semanas de abandonar el hábito alcohólico. En la cirrósis hepática la GGT está tambien elevada pero aquí no tiene ningún valor diagnóstico específico ya que está elevada en la mayor parte de las hepatopatías independientemente de su

etiología.

7.3.-MARCADORES DE HEPATOPATIA.

Las transaminasas GOT y GPT y la fostatasa alcalina no han mostrado diferencias cuando se han comparado entre los grupos A1, A2, y A3(que no tienen hepatopatía). En cambio estan elevadas en el grupo de pacientes cirróticos, con diferencias significativas ($p<0,001$ para la GOT y $p<0,01$ para la GPT y fosfatasa alcalina). Tampoco la bilirrubina total ha mostrado diferencias entre los grupos A1, A2, y A3 con cifras inferiores al mg/dl, pero sí estaba elevada en el grupo B (2.21+/-1.7 mg/dl) alcanzando cifras altamente significativas cuando se comparaban con cada uno de los grupos A.

La actividad de protrombina se ha encontrado dentro de la normalidad en todos los grupos A con valores extraordinariamente homogeneos (92.6+/-7, 92.6+/-7.2 y 92.9+/-8.2%) para los grupos A1, A2 y A3 respectivamente). En el grupo B la actividad de protrombina está por debajo de los valores considerados normales-(69.7+/-15.3%) con diferencias altamente significativas ($p<0.001$) al compararlas con cada uno de los grupos A.

Ninguno de estos parámetros puede utilizarse en nuestro grupo como marcador de alcoholismo sino de afectación hepática por el alcohol ya que solo se al-

teran en los pacientes con cirrósis hepática. Algunos autores consideran la GPT como un marcador de alcoholismo[147,185] pero esto no coincide con los resultados encontrados en nuestro estudio. Esto puede deberse a que en los citados estudios no excluyen a los pacientes con hepatopatía alcohólica y por tanto los resultados son distintos.

De los parámetros analizados, la AP, GOT y BT son los que han mostrado una mayor singnificación cuando se comparan los pacientes con y sin hepatopatía alcohólica ($p<0.001$); la GPT y la fosfatasa alcalina, aunque tienen significación estadistica ésta es menor.

El cociente GOT/GPT muestra valores mas altos en los pacientes de los grupos A2, A3 y B que el grupo A1. En la literatura hay una amplia referencia al valor del cociente GOT/GPT para el diagnóstico de hepatopatía alcohólica, de tal manera que un cociente mayor de 2 dificilmente se ve en una hepatopatía que no sea alcohólica.[37,79,134] Gil Extremera y cols[66] en su estudio de morfometría eritrocitaria encuentran una correlación lineal entre el cociente GOT/GPT y consumo enólico. Nosotros tambien encontramos un aumento progresivo de este parámetro a medida que aumenta el consumo de alcohol, pero este aumento solo es significativo al comparar el grupo A1 con todos los demás pero no es significativo al compararlo entre los grupos A2,

A3 y B. Nuestros pacientes cirróticos alcanzan un valor mas alto (1.63) que los no cirroticos pero no llegan a alcanzar el valor 2 citado en la literatura. Evidentemente, es cierto que un cociente mayor de 2 solo se ve en hepatopatías alcohólicas pero en esta enfermedad tambien pueden observarse valores inferiores a dos.El hecho de que nuestros cirróticos pertenezcan todos al estadio A de Child puede influir en que el cociente sea mas bajo de lo encontrado en la literatura ya que esta no hace referencia al estadio clínico.

Como se desprende de nuestro resultado, no podemos considerar el cociente GOT/GPT un marcador de alcoholismo a pesar de mostrar un discreto aumento a medida que aumenta el consumo de alcohol ya que no es significativo. Tampoco podemos considerarlo indicador de cirrosis hepática alcoholica al menos en estadios iniciales; es problable que en la cirrosis hepática avanzada tenga mayor valor diagnóstico como se deduce de la literatura.

Las proteínas totales no muestran diferencias significativas entre ninguno de los grupos indicando un buen estado nutricional de los pacientes.

La albúmina, en cambio, tiene un comportamiento distinto; los pacientes del grupo B muestran un descenso en comparación con los del A (41, 39.6, 41.2 y 32.9 g/l para los grupos A1, A2, A3 y B respectivamen-

te) que tiene valor significativo ($p<0.01$ para los grupos A1 y A2 y $p<0.05$ para el A3). Por tanto la albúmina puede considerarse marcador de hepatopatía pero no tiene valor en los pacientes sin hepatopatía en relación con el consumo de alcohol.

La alfa 1 globulina no muestra diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados y no podemos pues establecer ninguna relación con la ingesta etílica.

En cambio, si podemos establecer algunas diferencias en los grupos estudiados con respecto al comportamiento de la alfa 2 globulina. Los pacientes de los grupos A1, A2 y A3 tienen valores muy homogeneos (7.36+/-1.4, 7.42+/-1.77, y 7.34+/-1.89 g/l); los pacientes del grupo B muestran unos valores más bajos (6.13+/-1.93 g/l) alcanzando significación estadística ($p<0.05$) al compararlo con los anteriores. El motivo de este descenso es conocido; las alfa 2 glubulinas son unas proteinas en su mayoría sintetizadas por el hígado y sus valores descienden en pacientes con cirrósis hepática pero este descenso no guarda ninguna relación directa con el alcohol salvo por su capacidad de producir cirrósis hepática.

Las betaglobulinas son otras proteinas, al igual que las alfa 1, que no muestran comportamiento diferente en ninguno de nuestros grupos.

Las gammaglobulinas tampoco muestran ninguna di-

ferencia entre los grupos de pacientes sin hepatopatía (A1, A2 y A3) y sí muestran un aumento significativo en el grupo B, como cabía esperar ya que se trata de pacientes cirróticos. La hipergammaglobulinemia de los pacientes cirróticos tiene un origen multifactorial[76,173] desde una sobreestimulación continua del sistema inmunitario por antígenos procedentes del intestino en su mayoría, al fallar la barrera defensiva de las células Kuppfer, hasta una función aumentada de células B. Nouri Aria[131] estudió el papel de la células T y su capacidad inmunoregulatoria en pacientes con hepatopatía alcohólica en relación con la producción de inmunoglobulinas y encontró que había una hiperreactividad de células B y que la actividad supresora de células T para Ig G e Ig A estaba afectada. La respuesta de los linfocitos B al Pokeweed-Mitogen estaba disminuida no en su capacidad proliferativa sino en su capacidad de secretar IgG e IgA , sugiriendo un defecto de los linfocitos T helper. No encontró diferencias en el comportamiento de los cirróticos o pacientes con hepatitis alcohólica y concluye que los pacientes con hepatopatía alcohólica tienen una hiperreactividad de células B y un defecto de las células T en relación con la producción de inmonoglobulinas.

7.4.-LEUCOCITOS TOTALES Y NEUTROFILOS.

Nuestros pacientes presentan unos valores normales de leucocitos totales, tanto aquellos que son portadores de una cirrósis hepática como los que tienen un hígado sano, independientemente de la cantidad de alcohol que ingieran, sin que existan diferencias significativas, no pudiendo extraer pues ninguna consecuencia de nuestro estudio. Los polinucleares neutrófilos tuvieron un comportamiento similar al de los leucocitos totales, también sin encontrar diferencias significativas.

Aunque la mayor parte de las alteraciones de los leucocitos descritas en pacientes alcohólicos han sido cualitativas, fundamentalmente disminución de la adherencia, de la fagocitosis y sobre todo del quimiotactismo,[61,111] tambien se han descrito alteraciones cuantitativas. Mc Gregor[115] estudió la función leucocitaria en 10 pacientes hospitalizados para deshabituación de alcoholismo y encontró que el único defecto común a todos los pacientes era una quimiotaxis disminuida. De los 10 pacientes, 7 tenían recuento leucocitario anormal (cinco pacientes con menos de 5000 leuc/mm^3 y dos con más de 12000 leuc/mm^3) pero los autores dicen expresamente que no descartan que pudieran tener una hepatopatía alcohólica algunos casos. Liu[110] ha descrito nueve episodios de leucopenia en seis pacientes alcohólicos crónicos tras una trans-

gresión enólica sin que exitiese infección bacteriana concomitante, esplenomegalia o eritropoyesis megaloblástica en ningún caso. El número de neutrófilos maduros estaba disminuido tanto en sangre periférica como en médula ósea así como la reserva medular de neutrófilos. Los niveles séricos de vit. B12 estaban dentro de la normalidad aunque la capacidad de saturación de la vitamina B12 estaba disminuida. Todos los cambios retornaron a la normalidad al poco tiempo de abandonar el consumo de alcohol sin precisar ningún tipo de tratamiento.

Todos estos casos han sido observados de forma puntual y publicados como tales pero nosotros no hemos observado ninguna alteración cuantitativa de los leucocitos. Tampoco nuestros pacientes cirróticos tenían leucopenia ni diferencias significativas con los alcohólicos no cirróticos; los pacientes cirróticos sin infección suelen presentar leucopenia en relación con hipertensión portal e hiperesplenismo,pero ninguno de nuestros pacientes tenian hipertensión portal, lo que puede explicar estas diferencias.

7.5.MONOCITOS.

El número de monocitos en los distintos grupos no muestra variaciones que sean significativas.

No hay bibliografía acerca de variaciones cuantitativas de los monocitos circulantes en alcohólicos aunque sí se han descrito cambios funcionales en los macrófagos tisulares de animales a los que se les ha inducido alcoholismo experimentalmente, consistentes en que los macrófagos de los animales alcohólicos expresaban receptores de superficie C3b y Fc con mayor densidad que los no alcohólicos, a pesar de que su capacidad fagocítica a traves de estos receptores estaba disminuida.[10] El estudio de las alteraciones funcionales de las macrófagos queda fuera de los objetivos de esta investigación.

7.6.-INMUNOGLOBULINAS.

Los valores medios de Inmunoglobulina Ig M en los sujetos no cirróticos están dentro de la normalidad (139 mg/dl para el grupo A1, 112 para el grupo A2 y 197 para el grupo A3); no obstante el grupo A3 muestra valores mas elevados que el resto. Al hacer el tratamiento estadístico se aprecia que hay diferencias significativas entre los bebedores sociales A1 y moderados A2 al compararlos con los bebedores inveterados del grupo A3 ($p<$ de 0.05 y 0.01 respectivamente). Las inmunoglobulinas A y G tambien se encontraron dentro

de la normalidad en estos grupos sin que en estos casos existiesen diferencias significativas entre ellos.

En los pacientes alcohólicos se han descrito escasos cambios en las Inmunoglobulinas; Samgina y cols[157] encuentran en un grupo de alcohólicos crónicos una elevación de Ig A y un descenso de Ig M que desaparece a las cuatro semanas de abstinencia alcohólica. Bjorkholm[19] observa en pacientes alcohólicos que tras una ingesta excesiva de alcohol hay una elevación de Ig M. De todas formas estas alteraciones son mínimas. Nuestros pacientes del grupo A3 (bebedores inveterados) muestran un aumento significativo de Ig M a pesar de mantener abstención durante al menos 24 horas. La causa de este aumento de Ig M en alcohólicos crónicos sin hepatopatía permanece oscura y deberá ser objeto de investigaciones ulteriores. Quizas una sobreestimulación del sistema inmunitario por las infecciones de repetición puede explicarlo auque la normalidad de la Ig G va encontra de esta hipótesis.

Los pacientes cirróticos (grupo B) muestran un aumento de Ig G Ig A e Ig M con significación estadistica al compararlos con los pacientes no cirróticos. Se trata pues de un aumento policlonal y este coincide con lo descrito en la literatura: los pacientes cirróticos muestran un aumento policlonal de inmunoglobulinas que se mantienen más alla de un año despues de abandonar el consumo de alcohol.[3,178]

7.7.-POBLACIONES LINFOCITARIAS

Uno de los aspectos mas interesantes en el estudio del alcoholismo es el de las poblaciones linfocitarias. Hay una clara relación entre alteracion del sistema inmune celular y lesión producida por el alcohol. La posibilidad de cuantificar los distintos tipos de linfocitos mediante técnicas de anticuerpos monoclonales ha permitido estudios en este sentido. De la mayor parte de estos estudios se desprende que los pacientes que desarrollan una cirrósis hepática presentan alteraciones del sistema inmune celular que son secundarias a las alteraciones del hígado y en algunas escasas publicaciones se intenta demostrar que las alteraciones inmunitarias serían las responsables de la lesión hepática y determinarian la progresión de la enfermedad a pesar de la abstinencia alcohólica. A pesar de estos estudios permanece oscuro si las alteraciones inmunitarias son causa o consecuencia de la lesión.

Nuestro principal objetivo al planificar esta investigación clínica es intentar aclarar este dilema; evidentemente, si las alteraciones inmunitarias son causa de las lesiones producidas por el alcohol deben aparecer antes de que exista la lesión y serian consecuencia de la acción tóxica directa del alcohol o sus metabolitos sobre el sistema inmune. Para aclararlo determinamos los linfocitos totales, linfocitos B,

linfocitos T, linfocitos facilitadores (OKT4), linfocitos citotóxicos supresores (OKT8) y el cociente entre ambos en pacientes con alcoholismo social (A1), alcoholismo moderado (A2), alcohólicos inveterados (A3) en los que se ha descartado la existencia de hepatopatía y en un grupo de cirróticos abstinentes.

7.7.1.-Linfocitos totales.

El número de linfocitos totales se encuentra dentro de valores normales en todos los grupos estudiados; hay un descenso a medida que aumenta el consumo de alcohol (A1: 2338, A2: 2232, A3: 1993 linf/mm^3). Los pacientes del grupo B presentan cifras algo mas elevadas que el grupo A3 (2029 linf./mm^3) pero en ningún caso se aprecian diferencias significativas que muestren una influencia del alcohol sobre ellos.

Esto concuerda con los resultados de otros trabajos[16,176] en los que las cifras de linfocitos totales no varia entre abstemios y alcohólicos.

7.7.2.-Linfocitos B.

Tambien el número de linfocitos B ha estado dentro de límites normales, con valores similares entre todos los grupos, sin que hallamos podido encontrar ninguna diferencia significativa en relación con el grado de ingesta alcohólica. Tan solo los sujetos del grupo B muestran un descenso no significativo.

Estos resultados son concordantes con la mayoría de los hallazgos en investigaciones previas. Bers-

tein[16] en 1.974 encontró que el número de células B no diferia entre controles sanos e individuos afectos de hepatopatía alcohólica pero sí encontró un aumento significativo de células B en alcohólicos crónicos sin hepatopatía y no pudo explicar estos hallazgos. Otros estudios posteriores como el de Uribarrena en España[176] y Ericsson[56] en Texas no encuentran ninguna diferencia entre controles sanos y alcohólicos crónicos sin hepatopatía ni en pacientes cirróticos.

7.7.3.-Linfocitos T totales.

En nuestro estudio, las cifras totales de linfocitos T se encontró dentro de valores normales en todos los grupos. Se aprecia un descenso progresivo en los pacientes sin hepatopatía a medida que aumenta el consumo de alcohol (A1: 1605, A2: 1546, A3: 1353 linf.T/mm^3) pero que no tiene valor significativo. La cifra de linfocitos T en el grupo B (1491 Linf.T/mm^3) muestra unos valores intermedios.

Este comportamiento de los linfocitos T es paralelo al que se observa en la cifra de linfocitos totales y podemos considerarlo secundario a los cambios en estos y no a otros factores. Tenemos por tanto que concluir que en nuestro estudio no hay cambios significativos en los linfocitos T que puedan guardar relación con un mayor o menor consumo alcohólico o la existencia o no de hepatopatía.

Sin embargo, la mayor parte de trabajo publicados

a este respecto muestran que si bién el número total de linfocitos T no muestra diferencias entre controles sanos abstemios y alcohólicos sin hepatopatía, los pacientes con hepatopatía alcohólica tienen un descenso en el número total de linfocitos T.[16,62,85,116] En cambio Uribarrena[176] encuentra que el número total de linfocitos T era similar en el grupo control de abstemios sancs, en individuos alcohólicos con minimas alteraciones del hígado y en los cirróticos de origen alcohólico; sin embargo observa que los linfocitos T están descendidos en los pacientes con hepatitis alcohólica. Tambien Berstein[16] encuentra un marcado descenso de los linfocitos T en los pacientes con hepatitis alcoholica, mas acusado incluso que en sus pacientes con cirrósis hepática.

¿Que significado puede tener el descenso de linfocitos T descrito por la mayoría de los autores en pacientes cirróticos y más aún en pacientes con hepatitis alcohólica?. Desde luego no guarda relación con un efecto tóxico del alcohol ya que no se observa en alcohólicos sin hepatopatía; mas bien el descenso está en relación con la lesión hepática: necrosis celular e inflamación activa. De hecho los pacientes con esteatosis hepática no tienen descenso de linfocitos T y los pacientes con hepatitis alcohólica tienen en cambio un mayor descenso que los pacientes con cirrósis hepática. En la cirrósis hepática activa y aún mas en

la hepatitis alcohólica hay un componente inflamatorio en el hígado con infiltración de polinucleares y linfocitos; puede ocurrir que este inflitrado inflamatorio convierta al hígado en un lugar de secuestro para los linfocitos.[140]

¿Que explicación tienen nuestros resultados?. Son discordante con la mayoría de los autores excepto con Uribarrena; pensamos que la diferencia está en el criterio para seleccionar a los pacientes con hepatopatía alcohólica. El comportamiento de los cirróticos en estadío avanzado de su enfermedad con hipertensión portal, ascitis y esplenomegalia no es el mismo que el de un cirrótico en estadio A de Child. La hipertensión portal puede convertir al área esplácnica y al bazo en una zona de secuestro de linfocitos. Nuestros cirróticos son un grupo homogeneo en estadio A y los de Uribarrena pertenencen a los estadios A y B pero en el resto de trabajo no se hace referencia al grado clínico de cirrósis ni a la existencia o no de hipertensión portal; es probable que dentro de los cirróticos de estos autores esten incluidos un grupo muy heterogeneo de pacientes lo que explicaria las discordancias.

7.7.4.-Linfocitos OKT4.

No hay diferencias significativas entre los valores de linfocitos facilitadores entre ninguno de nues-

tro grupos y esto coincide con lo descrito hasta ahora en la literatura. En nuestro estudio hay un descenso progresivo que es máximo en el grupo B (A1: 895, A2: 873, A3: 799, B: 764 linf. OKT4/mm^3 respectivamente) pero que no tienen significación estadística y por tanto no nos permite extraer consecuencias.

7.7.5.-Linfocitos OKT8.

Los valores de linfocitos citotóxicos-supresores son similares entre los grupos A1 y A2, es decir entre aquellos individuos sin hepatopatía y que consumen menos de 160 g/día de etanol. Sin embargo, los pacientes que consumen mas de 160 g. y no tienen hepatopatía (A3) y los pacientes con cirrósis hepática muestran una disminución en el número total de linfocitos OKT8 que alcanza significación estadística.

La mayor parte de los autores[28,41,48] encuentran un descenso de linfocitos OKT8 en los pacientes con cirrósis hepática establecida aunque no lo han descrito en el alcoholismo crónico.

Fernández L.A.[62] ha publicado unos resultados parecidos; estudió las poblaciones linfocitarias en 4 grupos de pacientes: abstemios, bebedores sociales, alcohólicos sin hepatopatía y cirrósis alcohólica. Encontró que el número de linfocitos B era similar en los cuatro grupos pero el número de linfocitos T determinados mediante la técnica de formación de rosetas estaba descendido en el grupo de cirróticos. El sub-

grupo de células T que formaban rosetas con los hematies de carnero recubiertos por anticuerpo Ig M (llamadas células T μ) eran similares en los cuatro grupos; en cambio el subgrupo de células T que formaban rosetas con los hematies de carnero recubiertos de anticuerpos antieritrocito Ig G (células T gamma) estaba descendido en los pacientes con alcoholismo crónico cuando se comparaban con los controles y en el grupo de cirróticos cuando se comparaban con los alcohólicos crónicos, interpretandolo el autor como indicativo de suceptibilidad a padecer una enfermedad hepática en los alcohólicos crónicos.

Hay otras explicaciones que pueden ayudar a aclarar la patogenia de las lesiones inducidas por el alcohol. El hecho de que el descenso de linfocitos OKT8 se produzca en los cirróticos y también en los alcohólicos crónicos (cuando consumen mas de 160g/día de etanol) indica que no es secundario a afección hepática sino consecuencia de un efecto tóxico del alcohol o de sus metabolitos y que desconocemos. Un descenso de los linfocitos supresores puede dar lugar a una activación del sistema inmune al faltar el efecto supresor de estos linfocitos (acción inmunomoduladora).

Hay otras posibles explicaciones; sabemos por Lanier[80] que no todas las células que expresan en su superficie CD8 y que por tanto con técnicas de anticuerpos monoclonales se identificarian como OKT8 son

realmente linfocitos citotóxicos supresores sino que una parte de ellas, a las que les falta el marcador común a todas las células T, el antígeno CD3, son células asesinas naturales ("Natural Killers"). Chermeneva[29] hayó un descenso profundo de la actividad de estas células Killers en pacientes alcohólicos crónicos en comparación con los controles, de tal manera que la actividad de esta células podía definir dos grupos de alcohólicos: un grupo con actividad normal y un grupo con actividad disminuida. De acuerdo con este autor puede ocurrir que el descenso de linfocitos OKT8 sea a expensas de un descenso de células Killers incluidas en el subgrupo OKT8; en cambio Jovanovic[85] observó que el número total de células Natural Killers estaba aumentado en pacientes alcohólicos con esteatosis hepática pero no en cirróticos. Estos aspectos deben ser objeto de ulteriores estudios.

7.7.6.-Indice OKT4/OKT8

El índice OKT4/OKT8 muestra unos valores que se encuentran dentro de la normalidad en todos los grupos. Pero el grupo A3 de alcohólicos crónicos y el grupo B muestran unos valores mas altos que los bebedores sociales (A1) y moderados (A2) con diferencias que son significativas. Este aumento del índice en los grupos citados es consecuencia del descenso de linfocitos OKT8 en estos mismo grupos sin que puedan ex-

traerse mayores consecuencias.

7.8.-TEST DE TRANSFORMACION LINFOBLASTICA

La estimulación de los linfocitos con los mitógenos Fitohemaglutinina (PHA), Pokeweed Mitogen (PWM) y Concavalina A (Con A) muestra una marcada alteración de la inmunidad de caracter funcional en los pacientes con alcoholismo inveterado. La respuesta de los pacientes de los grupos A1 y A2 es similar, en ambos casos dentro de valores normales y sin que haya diferencias significativas. Podemos decir pués que el alcohol consumido por debajo de 160 g/día durante un periodo superior a 10 años no afecta a la respuesta proliferativa de los linfocitos ante estos mitógenos.

Cuando comparamos la respuesta proliferativa de los pacientes del grupo A1 y A2 con los sujetos del grupo A3 vemos que hay una intensa depresión de la respuesta proliferativa. Este es el aspecto mas novedoso del estudio que hemos realizado ya que hasta ahora no existen datos publicados de la exploración de la inmunidad mediante esta técnica en alcohólicos crónicos sin cirrósis hepática.

¿Porque puede producirse esta alteración?. Una posibilidad es que la membrana de los linfocitos esta alterada en los pacientes con alcoholismo crónico, como ocurre en la membrana de los hematies de los pacientes con cirrósis hepática[40] y alcohólicos crónicos

sin hepatopatía. Estudios de mofometría eritrocitaria realizados en pacientes con alcoholismo crónico y cirrósis hepática por Gil Extremera y cols[66] han mostrado no solo la macrocitosis ya conocida sino cambios en el perímetro, superficie e índice de circularidad de los hematies, indicando todo ello cambios profundos en la membrana de los hematies de estos pacientes. Estos cambios pueden ser debidos a determinados déficit nutricionales como folatos y Vit. B12[68] o a un efecto tóxico directo del alcohol sobre la célula madre hematopoyética que condicionaría un asincronismo en el desarrollo del núcleo y citoplasma en los eritroblastos medulares.[160] Estos mismos mecanismos podrían actuar sobre la membrana de los linfocitos de los pacientes alcohólicos pero a pesar de existir una amplia bibliografía sobre las repercusiones hematológicas de alcohol, no hay nada descrito sobre un efecto tóxico directo o indirecto del alcohol sobre la membrana de los linfocitos. El resultado final sería, de ser cierta esta hipótesis, una alteración de la membrana celular que interferiría las señales de transducción que inician la blastogénesis de los linfocitos.[167] Pero esto debe ser objeto de ulteriores estudios.

Hay otras posibles explicaciones. Los mitógenos extraidos de plantas, como los que hemos utilizado nosotros, inducen la mitogénesis de los linfocitos in-

teraccionando con los complejos T3-Ti y provocando la expresión de antígeno Tac y la secreción de interleukina 2. De esta forma se ponen en marcha los mecanismos de transducción de señal que inician la blastogénesis. Además, estos mitógenos actuan directamente sobre el sistema de transducción de señal protein-kinasa.[74,89] El alcohol puede interferir estos mecanismos de varias formas. Una de ellas es interfiriendo con la síntesis de Interleukina 2. Sin embargo Kaplan[87] estudió in vitro el efecto agudo del alcohol sobre la proliferación linfoblástica añadiendo alcohol a un cultivo de linfocitos y demostró que el alcohol inhibia la proliferación de los linfocitos T,pero en cambio no suprimía la producción de interleukina 2; la inhibición era producida por efecto directo del alcohol en el medio de cultivo. Esto podría explicar la falta de respuesta ante los mitógenios de los linfocitos de nuestros pacientes siempre que hubiesen ingerido alcohol en las últimas 12 horas pero nuestros pacientes no habian consumido alcohol al menos en las 24 horas previas a la extracción de sangre y por tanto no puede admitirse un mecanismo similar. Diamond[47] estudia los receptores de adenosina para AMPc en las membranas de linfocitos de pacientes con hepatopatía alcohólica, en hepatopatías no alcohólicas y en alcohólicos sin hepatopatía y encuentra un descenso en los pacientes con hepatopatía alcohólica mientras que los

individuos alcohólicos sanos y las hepatopatías de otra índole no tienen tal descenso y piensa que esto puede ser consecuencia del alcohol o bien indicar una predisposición genetica al alcoholismo. Los receptores de adenosina son proteínas de membrana cuya activación causa aumento de AMPc. Estos mismos receptores parecen mediar algunos de los efectos tóxicos del alcohol en el cerebro e igualmente podría ocurrir en los linfocitos.

Barlas[12] estudió los niveles de AMPc en los linfocitos de pacientes con cirrósis hepática alcohólica, hepatopatía alcohólica y alcohólicos sin hepatopatía, tanto en condiciones basales como tras estimulación con factor humoral tímico y hayó un descenso solo en pacientes con hepatitis alcohólica aunque la respuesta al factor humoral tímico era normal, indicando esto una disfunción inmune en los pacientes con hepatitis alcohólica. Hasta ahora no se ha descrito ninguna alteración en los mecanismos de transducción de señal en alcohólicos sin hepatopatía.

Una explicación muy sugerente de estos fenómenos es que los pacientes alcohólicos tengan en situación de reposo una alta proporción de linfocitos T citotóxicos activados; este fenómeno, que se ha encontrado en pacientes con hemodiálisis crónica[27] y en enfermedades autoinmunes, determinaría por su efecto supresor sobre el resto de los linfocitos una falta de respues-

ta proliferativa a los mitógenos. Denys[46] ha demostrado en pacientes con cirrosis hepática de origen alcohólico una activación en reposo de los linfocitos T mediante la determinación de una serie de marcadores de activación (producción basal de interleukina 2, expresión de receptores de interleukina 2 Tac, expresión de antígeno Ia), asociada a una falta de respuesta a mitógenos.

Bonagno y cols[20] estudian 15 alcohólicos crónicos y 8 sujetos sanos como controles y encuentran una activación en situación basal del sistema inmunitario caracterizado por un incremento en las células T DR positivas.

Esta activación del sistema inmune en condiciones basales explicaría una cierta resistencia a la proliferación con mitógenos de los linfocitos de los pacientes alcohólicos bien porque estuviesen previamente en proliferación o porque la activación previa de los linfocitos supresores impediría la proliferación de los linfocitos en respuesta a los mitógenos.

Un estado de activación previa de los linfocitos T tiene extraordinaria importancia para la interpretación del poder patógeno del alcohol sobre algunos tejidos de la economía como puede ser el hígado. El consumo intenso y continuado del alcohol produciría una alteración de la estructuras celulares (por ejemplo, membranas celulares) y algunos de los componentes de

estas estructuras actuaría como antígeno al que se sensibilizarían los linfocitos y se activarían, conduciendo a una lesión celular. Cochrane y cols[36] investigaron la posibilidad de una reacción autoinmune frente a proteinas específicas del hígado en pacientes con hepatopatía alcohólica; para ello estudiaron el efecto citotóxico de los linfocitos sobre hepatocitos aislado en 27 alcohólicos. Encontraron la existencia de citotoxicidad en 15 de 17 pacientes con el diagnóstico de hepatitis alcohólica, pero en ninguno de los 10 con otras formas de hepatopatía alcohólica. La capacidad de una lipoproteina específica de la membrana del hepatocito para bloquear la reacción les sugería que una sensibilización a este antígeno era la responsable del desarrollo de citotoxicidad. Depleccionando las muestras de linfocitos T, estos autores demostraron que se mantenía el efecto citotóxico, sugiriendo la existencia de un anticuerpo dependiente de una reacción mediada por células. Además encontraron una estrecha correlación del efecto citotóxico con la hialina de Mallory, necrosis de los hepatocitos y necrosis en sacabocados pero no con otros hallazgos histológicos ni con inmunoglobulinas, autoanticuerpos o test de función hepática y piensan que la persistencia de esta respuesta autoinmune, inducida de alguna forma por el alcohol o uno de sus metabolitos, puede ser importante en la progresión de hepatitis alcohólica a

cirrosis hepatica. Actis[1] Izumi[81] y Porolla[142] encuentran unos resultados similares y llegan a las mismas conclusiones.

Pues bién, al igual que esta actividad citotóxica se ha demostrado en estadios iniciales de hepatopatía alcohólica y puede condicionar su progresión a cirrosis, es probable que pueda desarrollarse antes de que aparezca ningún tipo de alteración histológica ni de los test de función hepática en pacientes con alcoholismo crónico, siendo la responsable del estado de preactivación de los linfocitos en los alcohólicos y su consecuencia un efecto citotóxico que conduciría a la lesión orgánica en el hígado y posiblemente en otros órganos. Bergroth[15] investigó in situ el subtipo de células mononucleares y la expresión de marcadores de activación en biopsias de pacientes con esteatosis hepática; encontró que las células B y los monocitos eran muy escasos, la mayoría de la células eran linfocitos T, con una proporción T4 a T8 de 2 a 1 y la proporción de células Ia (HLA-DR positivas) oscilaban sobre 15 y 30% indicando que las células T en la esteatosis hepática de origen alcohólico no son inocentes sino que participan activamente en el proceso inflamatorio. Sin embargo la tinción para Tac, 4F2 y T9 era negativa, sugiriendo que la activación local de células T puede ser incompleta y no tan extensa como en una enfermedad autoinmune hepática.

Alteraciones del sistema endocrino inducidas por alcohol pueden estar implicadas en la génesis de estas alteraciones. Watson[182] estudió el efecto del alcohol en varones adultos; encontró que los niveles plasmáticos de corticosteroides estaban elevados en individuos alcohólicos de toda la vida y también en alcohólicos que ya habían abandonado el hábito (estos últimos sin significación estadística). Los niveles de endorfinas estaban elevados en pacientes alcohólicos con cirrosis y pancreatitis alcoholica, al mismo tiempo que encontraba una disminución de la mitogénesis de linfocitos T inducida por Fitohemaglutinina y Concavalina A en los pacientes bebedores actuales y menos en los bebedores antiguos (estos sin significación estadística) y un aumento de células T helper en todos los tipos de alcohólismo; las células T citotóxicas estaban elevadas solo en los pacientes con cirrósis o pancreatitis alcohólica. Piensa el autor que existe una relación entre las alteraciones inmunitarias y endocrinas encontradas en el alcoholismo.

Por último, puede ocurrir que una alteración funcional de los macrófagos pueda interferir con la actividad proliferativa de los linfocitos frente a los mitógenos. La proliferación de las células T inducida por mitógenos del grupo de las lectinas como las utilizadas por nosotros requiere la presencia de monocitos. Ceupens y cols[26] demuestran que la interleukina 6

representa parte de una actividad facilitadora derivada de los monocitos necesaria para la estimulación de los linfocitos T con PHA. Las células T de sangre o de amigdalas que han sido depleccionadas de células accesorias (monocitos y células Killers) no proliferan en respuesta a la PHA sola pero la adición de un cultivo de monocitos, a los que se ha extraido el sobrenadante y por tanto sin interleukina 2, trae como consecuencia la proliferación de las células T. Los monocitos son capaces de metabolizar el alcohol a un ritmo comparable al de los hepatocitos por via del citocromo P 450. Por otra parte, radicales libres de O_2 intervienen en la metabolización del alcohol en los tejidos y los monocitos son capaces de producir gran cantidad de superóxido; cabe la posibilidad de que el anión superoxido pueda intervenir en el metabolismo del etanol por los macrófagos. Se ha demostrado que el radical superoxido afecta negativamente a la proliferación de los linfocitos por mitógenos.[179]

Un hallazgo sorprendente es el que encontramos al comparar los resultados de los test de transformación linfoblástica en los grupos A1 y A2 (bebedores de menos de 160 g/día de alcohol) con el grupo B (cirróticos). Los valores medios son mas bajo en el grupo B pero sin alcanzar diferencias significativas; es decir, los pacientes cirróticos tienen una respuesta practicamente normal. En cambio, cuando los comparamos

con el grupo A3 de bebedores de más de 160 g/día vemos que estos tienen una respuesta significativamente menor que los pacientes con cirrósis alcohólica. Podemos afirmar pues que la falta de respuesta proliferativa está en el alcohol y no en la existencia de hepatopatía.

Sin embargo, hay trabajos publicados en los que encuentran una disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos de los pacientes cirróticos en respuesta a la estimulación con mitógenos. Denys y cols[46] estudian la capacidad proliferativa de las células mononucleares frente a mitógenos como PHA, Con A y PMA (promotor de tumores) en 15 cirróticos y en 15 controles sanos. Ninguno de los cirróticos consumía alcohol. Encuentran una intensa depresión de la capacidad proliferativa de los linfocitos. Cuppone y cols[43] en cambio encuentran en su estudio una respuesta proliferativa basal de los linfocitos de los cirróticos frente a PHA de 92.45+/-4 c.p.m., que es una respuesta absolutamente normal y coincide con nuestos resultados.

¿Que interpretación puede darse a unos resutados tan dispares?. Nuestros pacientes cirróticos estaban asintomáticos y pertenecían al estadio A de la clasificación de Child. Los pacientes de Denys pertenecían a los grados B y C y tenían hipertensión portal y varices esofágicas. Hay trabajos que demuestran que

una concentración elevada de amonio en sangre, insuficiente para producir encefalopatía, puede suprimir la capacidad proliferativa de los linfocitos frente a mitógenos lectínicos.[92] Puede ocurrir que en estadios avanzados de la clasificación de Child, como es el caso de los pacientes de Denys, los niveles de amonio en sangre esten suficientemente elevados como para inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos, lo que explicaria unos resultados tan discordantes.

Aunque me gustaria pensar que la respuesta normal de los cirróticos a los mitógenos sea expresión de una recuperación del estado funcional de los linfocitos una vez suprimido el consumo de bebidas alcohólicas, mi inclino mas a creer, como Cochrane, que hay una citotoxicidad que aparece ya en alcohólicos crónicos antes de que haya ningún daño histológico, se mantiene durante el desarrollo de lesiones que pueden ser previas a la aparición de cirrosis hepática como hepatitis alcohólica y desaparece una vez establecida esta, siendo la responsable del daño producido por el alcohol.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

Del estudio realizado podemos extraer las siguientes conclusiones:

8.1.- El volumen corpuscular medio es el marcador más precoz de alcoholismo, aumentando su valor significativamente cuando se consume más de 80 g. de alcohol diarios durante mas de 10 años, consumo muy frecuente en nuestra población. La gamma glutamil transpeptidasa es un marcador menos sensible y mas tardío.

8.2.- Hay un aumento progresivo del cociente GOT/GPT a medida que aumenta el consumo de alcohol y que es máximo en los pacientes con cirrósis hepática pero no es significativo y no podemos usarlo ni como marcador de alcoholismo ni para implicar al alcohol en la causa de una hepatopatía en estadios iniciales.

8.3.- Los pacientes alcohólicos crónicos sin hepatopatía no muestran ningún cambio en los parámetros de afectación hepática ni tampoco en la albúmina o globulinas, que pueda relacionarse con el consumo de alcohol.

8.4.- El abuso del alcohol no produce cambios cuantitativos en los leucocitos totales, neutrófilos ni en los monocitos de sangre periferica. Tampoco los pacientes cirróticos en estadío A de Child muestran

alteración de estos parámetros.

8.5.- Los pacientes alcohólicos crónicos, cuando consumen mas de 160 g. de alcohol diario durante al menos 10 años, muestran un aumento significativo de IgM cuyo origen permanece sin aclarar.

8.6.- Los linfocitos totales, aunque disminuyen ligeramente, no experimentan ningún cambio en relación con el consumo de alcohol ni con la existencia de hepatopatía alcohólica.

8.7.- Los linfocitos B tampoco sufren ninguna modificación cuantitativa en relación con el alcohol o la existencia de cirrosis hepática.

8.8.- Los linfocitos T totales disminuyen ligeramente al aumentar el consumo de alcohol pero sin significación. Tampoco los pacientes con cirrósis hepática, bien nutridos y sin hipertensión portal, muestran cambios en las cifras de linfocitos T totales.

8.9..- Los linfocitos facilitadores OKT4 no varian cuantitativamente a medida que aumenta el consumo de alcohol o se desarrolla una hepatopatía alcohólica.

8.10.- Los linfocitos citotóxicos supresores OKT8 disminuyen significativamente cuando el consumo de

alcohol supera los 160 g. diarios durante un periodo de al menos 10 años y se mantiene en los pacientes con cirrósis hepática alcohólica despues de haber abandonado el consumo de alcohol. Parece estar causado por un efecto tóxico directo del alcohol o de sus metabolitos. Este descenso puede influir en la tendencia a las infecciones de los pacientes alcohólicos y estar relacionado causalmente con el desarrollo ulterior de una cirrósis hepática.

8.11.- El índice OKT4/OKT8 aumenta progresiva y significativamente a medida que aumenta la ingesta alcohólica, y los valores mas altos los muestran los pacientes cirróticos, siendo este aumento consecuencia de la disminución de los linfocitos OKT8.

8.12.- Los pacientes alcohólicos crónicos inveterados, cuando consumen 160 o más g. diarios de alcohol durante 10 años muestran una alteración funcional de los linfocitos B y T que se manifiesta por una falta de respuesta blastogénica a la estimulación con Pokeweed mitogen, Fitohemaglutinina y Concavalina A que puede estar implicada tanto en la tendencia a las infecciones de los alcohólicos como en el desarrollo ulterior de cirrósis hepática.

Los pacientes cirróticos sin hipertensión portal y que han abandonado el consumo enólico no muestran

ninguna alteración funcional de los linfocitos en la respuesta a mitógenos, por lo que podemos considerar al alcohol o a uno de sus metabolitos responsable de esta alteración.

8.13.- Las alteraciones de la eritropoyesis en los pacientes alcohólicos preceden a las alteraciones inmunitarias.

8.14.- Las alteraciones inmunitarias encontradas en los alcohólicos, tanto el descenso de linfocitos OKT8 como una depresión de la respuesta proliferativa por parte de los linfocitos B y T, preceden al desarrollo de cirrósis hepática y pueden estar implicadas en su aparición.

8.15.- Las alteraciones inmunitarias encontradas en los pacientes alcohólicos crónicos sugieren un mecanismo autoinmune en la aparición de hepatopatía alcohólica y en su progresión a cirrosis hepática.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

1.- Actis, G.; Mieli-Vergani, G.; Portmann, B. et al.
"Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in alcoholic liver discase".
Liver, 1983; 3: 8 - 12

2.- Acuto, O.; Meuer, S.C.; Hodgdon, J.C. et al.
"Peptide variability exist within the alpha and beta subunits of the T cell receptor for antigen".
J. Exp. Med., 1.983; 158: 1368-73

3.- Akdamar, K.; Epps, A. Ch.; Maumus, L.T. et al.
"Immunoglobulin changes in liver disease".
Annals N.Y. Acad. Sci. USA, 1972; 197: 101-7

4.- Alderman, J.; Takagi, T.and Lieber, C.S.
"Ethanol metabolizing pathways in deer-mice: estimation of flux calculated fron isotope effects".
J. Biol. Chem., 1987; 262: 7497-503.

5.- Alonso Fernández, F.
"Epidemiología del alcoholismo en España"
II Congreso Hispano Luso de Gastroenterología.
Sevilla, 1980.

6.- American Psychiatric Association.
"Diagnosis and statiscal manual of mental disorders (D.S.M-III)".
Washington D.C. American Psychiatric Association 1.980.

7.- Anthony, R.; Farquharson, M. and Mc Swen, R.N.
"Liver membranes antibodies in alcoholic liver disease. II. Antibodies to ethanol-altered hepatocytes".
J. Clin. Pathol., 1983; 36:1302-8

8.- Arai, M.; Leo, M.A.; Nakano, M. et al.
"Biochemical and morphological alterations o baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption".
Hepatology, 1984; 4: 165-74

9.- Avery, D.
"Nunca en el cumpleaños de la Reina Victoria: Historia de las Minas de Rio Tinto".
Ed. Labor S.A. Barcelona. 1985

10.- Bagasra, O.; Howeedy, A. and Kajdacsy-Balla, A.
"Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis".
Immunology, 1988; 65: 405-9

11.- Ballieux R.E. and Heijnen, C.J.
"Immunoregulatory T cell subpopulations in man: dissection by monoclonal antibodies and Fc receptors".
Immunol. Rev., 1983; 74:5-28

12.- Barlas, N.: Mutchnick, M.G.; Grant, G.J. et al.
"The Effect of thymic humoral factor on intracellular lymphocyte cyclic AMP in alcoholic liver disease".
Thymus, 1983; 5: 433-7

13.- Begleiter, H.; Porjesz, B.; Bishari, B. et al.
"Event- related brain potentials in boys at risk for alcoholism".
Science, 1984; 225: 1493-6

14.- Behrens, V.J.; Worner, T.M.; Braly, F. et al.
"Carbohydrate deficient transferrin, a marker for chronic alcohol cosumption in different ethnic populations".
Alcoholism (N.Y.), 1988; 12: 427-32

15.- Bergroth, V.; Konttinen, Y.T.; Segerberg-Konttinen, M. et al
"Phenotypic in situ characterization of lymphocytes in mild alcoholic liver disease".
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 1986; 94: 337-41.

16.- Berstein, I.M.; Webster, K.H.; Williams, R.C. Jr. et al.
"Reduction in circulating T lymphocytes in alcoholic liver disease".
Lancet, 1974· II: 488-90.

17.- Beutler, B. and Cerami, A.
"Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin".
Nature, 1986; 320: 584-8

18.- Beutler, B. and Cerami, A.
"Cachectin: more than a tumor necrosis factor".
N. Engl. J. Med., 1987; 316: 379-85

19.- Bjorkholm, M.
"Immunological and hematological abnormalities in chronic alcoholism".
Acta Med. Scand., 1980; 207: 197-200

20.- Bonanno, G.; Bocchini, G.; Canevari, A. et al.
"Immunological imbalance in uncomplicated chronic alcoholism".
Drug. Alcohol Depend., 1983; 12: 189-96

21.- Bosrom, W.F. and Li, T.K.
"Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde deshidrogenases and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism".
Hepatology, 1986; 6: 502-10

22.- Brayton, R.G. Stokes, P.E.; Schwartz, M.S. et al.
"Effect of alcohol and variuns diseases on leukocyte movilization, phagocytosis and intracellular bacterial Killing".
N. Engl. J. Med., 1970; 282: 123-8

23.- Brenner, M.B.; Mc Lean, J.; Dialynas, D.P. et al.
"Identification of a putative second T- cell receptor".
Nature, 1986; 322: 145-9

24.- Caballeria, J.; Baraona, E. and Lieber, C.S..
"The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat".
Life Sci., 1987; 41: 1021-7

25.- Canguly, R. and Waldman, R.H.
"Local immunity and local immune response"
Progr. Allergy, 1980; 27: 1-68

26.- Ceupens, J.L.; Baroja, M.L.; Lorre, K. et al.
"Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accesory signal".
J. Immunol., 1988; 141: 3868 - 74.

27.- Chatenoud, L.; Dugas, B.; Beauran, G. et al.
"Presence of preactivated T cell in hemodialyzed patients: their possible role in altered immunity".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1986; 83: 7457 - 61

28.- Chelazzi, G.; Piccinelli, O.; Senaldi, G. et al.
"Characterization of circulating T lymphocyte subset in alcoholic liver disease by monoclonal antibodies: correlation with the absolute lymphocyte count".
Boll. Ist. Sieroter. Milan., 1985; 64: 131 - 4

29.- Chermeneva, L.M.; Dovgii, A.V. and Cheknev, S.B.
"Natural killer cells in patients with chronic alcoholism".
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1988; 5: 69 - 72.

30.- Chick, J.; Kreitman, N. and Plant, M.
"Mean cell volume and gammaglutamil transpeptidase as markers of driking in working men".
Lancet, 1981; I: 1249 - 51

31.- Child, C.G.
"The liver and portal hypertension". In: Mayor Problems in Clinical Surgery, Vol.I. Child, C.G. (Edit) Philadelphia, London and Toronto: WB Saunders. 1964

32.-Clark, S.C. and Kamen, R.
"The human hematopoietic colony-stimulating factors".
Science, 1987; 236: 1229 - 37

33.- Cleary, P.D.; Miller, M.; Booker, T. et al.
"Prevalence and recognition of alcohol abuse in a Primary Care Population".
Am. J. Med., 1988; 85: 466 - 71

34.- Cline, M.J. and Golde, D. W..
"Cellular interations in hematopoiesis".
Nature, 1979; 277: 177 - 81

35.- Cloninger, C.R..
"Neurogenic adaptative mechanism in alcoholism".
Science, 1987; 236: 410 - 6.

36.- Cochrane, A.M.; Moussouros, A.; Portman, B. et al.
"Lymphocyte cytotoxicity for isolated hepatocytes in alcoholic liver desease".
Gastroenterology, 1977; 72: 918 - 23.

37.- Cohen, J.A. and Kaplan, M.M.
"The SGOT/SGPT ratio. An indicator of alcoholic liver disease".
Am. J. Dig. Dis., 1979; 24: 835 - 8.

38.- Cohen, S.; Pick, E.; Oppenhein, J.J. Eds.
"Biology of the lymphokines".
New. York. Academic. Press, 1979.

39.- Cooper, M.D.
"B lymphocytes: normal development and Function".
N. Engl. J. Med., 1987; 317: 1452 - 6.

40.- Cooper, R.A.; Diloy-Puray, M.; Lando, P. et al.
"An analysis of lipoproteins bile acids and red cell membranes, associated with target cells and spur cells in patients with liver cirrhosis".
J. Clin. Invest., 1972; 51: 3182 - 92

41.- Couzigou, P.; Vincendeau, P.; Fleury, B. et al.
"Etude des modifications des sous-populations lymphocytaires circulantes au cours des hepotopathies alcooliques. Role respectif de l'alcool, de l'insuffisance hepato-cellulaire et de la denutrition".
Gastroenterol. Clin. Biol., 1984; 15 -19.

42.- Crowley, J.P. and Abramson, N..
"Effect of ethanol on complement-mediated chemotaxis".
Clin. Res., 1971; 19: 415 - 9.

43.- Cuppone, R.; Del Vecchio, S.; Zanninelli, G. et al.
"Lymphocyte function test in cirrhotic patients under treatment with Spironolactone and Potassium Canrenoate".
J. Int. Med. Res., 1988; 16: 436 - 42.

44.- Cyr, G. and Warman, S.A.
"The effectiveness of routine screening questions in the detection of alcoholism".
JAMA, 1988; 259: 51 -4.

45.- De Meo, A.N. and Andersen, B.R.
"Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhosis patients".
N. Engl. J. Med., 1972; 286: 735 - 40.

46.- Deviere, J.; Denys, D.C.; Schandere, L. et al.
"Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis".
Clin. Exp. Immunol. 1988; 72: 377 - 382.

47.- Diamond, I.; Wrubel, B.; Estrin, W. et al.
"Basal and adenosine receptors-stimulated levels of c AMP are reduced in lymphocytes from alcohol patients".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 1413 -6.

48.- Diez Ruiz, A.; Gil Extremera, B.; Gutiérrez Gea, F. et al.
"Serum Inmunoglobulins and T cell subpopulations in alcoholic cirrhosis after oral zinc therapy".
Gastroenterol. Clin. Biol., 1988; 12: 584.

49.- Dinarello, C.A.
"Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response".
N. Engl. J. Med., 1984; 311: 1413 - 8.

50.- Dinarello, C.A.
"An update of human interleukin-1: fron molecular biology to clinical relevance".
L. Clin. Immunol., 1985; 5: 287 - 97.

51.- Dinarello, C.A.
"Interleukin 1: aminoacid sequences, multiple biological activities and comparison with tumor necrosis factor (cachectin)".
Year. Immunol, 1986; 2: 68 - 89.

52.- Dinarello, C.A. and Mier, J. W.
"Lymphokines".
N. Engl. J. Med., 1987; 317 : 940 - 5.

53.- Dipadova, C.; Worner, T.M.; Julkunen, R.J.K. et al.
"Effects of fastin and chronic alcohol consumption on the firt-pass metabolism of ethanol".
Gastroenterology, 1987; 92: 1169 - 73.

54.- Donohue, T.M. Jr.; Tuma, D.J. and Sorrell, M.F.
"Acetaldehyde adducts with protein: binding of (C^{14}) acetaldehyde to serum albumin".
Arch. Biochem. Biophys., 1983; 220: 239 - 46.

55.- Dustin,M.L.; Sanders, M E ; Shaw, S. et al.
"Purified lymphocyte function - associated antigen 3 bind to CD- 2 and mediates T lymphocyte adhesion".
J. Exp. Med., 1987; 165: 677 - 92.

56.- Ericsson, C.D.; Kohl, S; Pickering, L.K. et al.
"Mechanism of host defense in well nourished patients with chronic alcoholism".
Alcoholism (N.Y.), 1980; 261 - 5.

57.- Evans, R.L.; Lazarus, H.; Penta, A.C. et al.
"Two functionally distinct subpopulations of human T cell that colaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell mediated lympholisis".
J. Immunol., 1978; 120: 1423 - 8.

58.- Fabbi, M.; Acuto, O.; Smart, J.E. et al.
"Homology of i alfa-subunit of a T cell antigen/MHC receptor with immunoglobulin".
Nature, 1984; 312: 269 - 71.

59.- Fauci, A.S.; Lane, H.C. and Wolkman, D.J.
"Activation and regulation of human immune responses: implications in normal and disease states".
Ann. Int. Med., 1983; 99: 61 - 75.

60.- Feinman, L. and Lieber, C.S.
"Toxicity of ethanol an others components of alcoholic beverages".
Alcoholism: Clin an Exp. R., 1988; 2: 2 - 6.

61.- Feuliu, E.; Cardellach, J.M.; Vives-Corrous, J.L. y cols.
"Aspectos funcionales de los fagocitos en el alcoholismo y en la insuficiencia hepática".
Sangre, 1982; 27: 643 - 57.

62.- Fernández, L.A.; Lalton, M. and Fox, R.A.
"A study of T cell populations in alcoholic cirrhosis and chronic alcoholism".
Clin. Invest. Med., 1982; 5: 241 - 5.

63.- Fox, D.A.; Hussey, R.E.; Fitzgerald, K.A. et al.
"Activacion of human thymocytes via the 50 kd T_{11} sheep erytrocyte binding protein induces the expression of interleukin-2 receptors on both T_3 + and T_3 - populations".
J. Immunol., 1985; 134: 330 - 5.

64.- Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A.A.
"Lymphocyte population kinetics in the mouse".
Immunol. Rev. 1986; 91: 5 - 37.

65.- French, S.W.
"The Mallory body: structure, composition and pathogenesis".
Hepatology, 1981; 1: 76 - 83.

66.- Gil Extremera, B; Romero Ortiz, A.; Maldonado Martin, A. y cols.
"Morfometria eritrocitaria en el alcoholismo".
An. Med. Intern., 1989; 6: 454 - 57.

67.- Gili, M.; Orta, D.; Salleras, L. y cols.
"L'impacte de l'alcoholisme sobre la mortalitat a Espanya". En Curs de Drogodependencies. Institut d' Estudis de la Salut. Generalitat de Catalunya. 1982.

68.- Gimferrer, E.
"La macrocitosis del hepático: estudio de los folatos y vitaminas B_{12} hemáticos".
Sangre, 1982; 27: 612 - 28.

69.- Graciano, F. M. and Bell, C.L.
"La respuesta inmunitaria y sus posibles alteraciones". En: Clinicas Médicas de Norteamerica (Ed.Esp.).Emalsa. Madrid, 1985; 3 - 467 - 80.

70.- Grimm, E.A.; Mazumder, A.; Zhang, H.C. et al.
"Lymphokine-activated Killer cell phenomenon: lysis of natural Killer- resistant fresh solid tumor cells by interleukin- 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes".
J. Exp. Med., 1982; 155: 1823 - 41.

71.- Groopman, J.E. and Golde, D.W.
"The histiocytic disorders: a pathophysiologic analysis".
Ann. Int. Med., 1981; 94: 95 - 107.

72.- Grupta, S. and Good, R.A.
"Subpopulations of human T lymphocites: laboratory and clinical studies".
Immunol. Rev. 1981; 56: 89 - 114.

73.- Guerri, C.
"Bases bioquímicas de la toxicidad del alcohol: importancia del acetaldéhido".
Drogalcohol, 1979; 4: 111 - 8.

74.- Hadden, J.W.
"Transmembrane signal in the activation of T lymphocytes by mitogenic antigen".
Immunol. Today, 1988; 9: 235 - 9.

75.- Haynes, B.F. and Faucy, A.S.
"Introducción a la inmunología Clínica".
En: Harrison: Principios de Medicina Interna.
Braunwald, E. Inelbader, K.J. y Petersdorf, R.G
Edit. Interamericana-Mc Graw-Hill Ed. 1989: 403 -14.

76.- Herreras Gutierrez, J.M. y Pérez Cano, R.
"Hígado y alcohol"
Laboratorio Delagrange(Ed.). Ed Castalia. Madrid. 1979; 124 -5

77.- Herrerias Gutiérrez, J.M. y Pérez Cano, R.
"Aspectos epidemiclógicos generales del alcoholismo en el mundo occidental". II Congreso Hispano-Luso de Gentroenterología. Sevilla 1980.
En Herrerias Gutiérrez, J.M. Ed. Higado y Alcohol. Jarpyo Editores. 1982; 63 - 71.

78.- Hoerner, M.; Behrens, V.J.; Worner T.: et al.
"The role of alcoholism and liver disease in the appearance of serum antibodies against acetaldehyde adducts".
Hepatology, 1988; 8: 569 - 74.

79.- Humbert, M.; Vilalta, J.; Treserra, J. y cols.
"Detección de alcoholismo en el Hospital General. Instrumentos psicometricos y biológicos".
Med. Clin., 1987; 88: 670 - 3.

80.- Hüning, T. and Bevan, M.J.
"Specificity of T-Cell clones illustrate altered self hypothesis".
Nature, 1981; 294: 460 -2.

81.- Izumi, N.; Hasumura, Y.; Takeuchi, J.
"Lymphocyte cytotoxicity for autologous human hepatocytes in alcoholic liver disease".
Clin. Exp. Immunol., 1983; 54: 219 -24.

82.- Janossy, G. and Prentice, H.G.
"T cell subpopulations, monoclonal antibodies and their therapeutic applications".
Clin. Haematol., 1982; 11: 631 - 60.

83.- Jeske J.J. and Capra, J.D.;
"Immunoglobulins: structure and function".
In: Paul W.E. ed. Fundamental Immunology.
New York: Raven Press, 1984; 131 - 65.

84.- Johnston, P.B.
"Monocytes and macrophages".
N. Engl. J. Med., 1988; 318: 747 - 52

85.- Jovanovic, R.; Worner, T.; Lieber, C.S. et al.
"Lymphocyte subpopulation in patients with alcoholic liver desease".
Dig. Dis. Sci., 1986; 31: 125 - 30.

86.- Julkunen, R.J.; Di Padova, C. and Lieber, C.S.
"First-pass metabolism of ethanol - A gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol".
Life Sci., 1985; 37: 567 - 73.

87.- Kaplan, D.R.
"A novel mechanism of immunosuppression mediated by ethanol".
Cell. Inmunol., 1986; 102: 1 - 6.

88.- Kapplan, M.M.
"Alkaline phosphatase".
Gastroenterology, 1972; 62: 452 - 68.

89.- Kay, J.E. and Benzie, C.R.
"Lymphokine activation by OKT_3: ciclosporine sesitivity and synergism with phorbol ester".
Immunology, 1986; 57: 195 - 9.

90.- Kelly, D.A: and Summerfield, J.A.
"Hemostasis in liver disease".
Sem. Liver.Dis., 1987; 7: 182 - 91.

91.- Kishimoto, T.

"B cell stimulatory factors (BSFs): molecular structure, biological function and regulation of expression".

J. Clin. Immunol., 1987; 7: 343 - 55.

92.- Kluscinski, W.; Ostaszewski, P.; Winnick, A. et al.

"Suppression of mitogenic activity of T lymphocytes by subtoxic concentration of ammonia in blood".

Zutralb. Veterinarmed, 1988; 35: 626 - 31.

93.- Kuno, M. and Gardner, P.

"Ion channels activated by inositol 1, 4, 5 Triphosphate in plasma membrana of human T lymphocytes".

Nature, 1987; 326: 301 - 4.

94.- Lainer, L.L.; Le, A.M.; Phillips, J.A. et al.

"Subpopulation of human natural killer cells defined by expression of leu - 7 (H.N.K.-1) and leu II (N.K.15) antigens".

J. Immunol., 1983; 131: 1789 - 96.

95.-Laposata, E.A. and Lange, L.E.

"Presence of monoxidative ethanol motabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse". Science, 1986; 231: 497 - 9.

96.- Lelbach, W.K.

"Cirrhosis in the alcoholic and its relatior to the volume of alcohol abuse".

Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 1985; 252: 85 - 105.

97.- Lelbach, W.K.

"Epidemiology of alcoholic liver disease". En: Alcoholic liver disease.

Ed. Hall P., Londres, Edward Arnol Ltd. 1985

98.- Leo, M.A. and Lieber, C.S.

"Hepatic vitamin A deplection in alcoholic liver injury".

N.Engl. J.Med., 1982; 307: 597 - 601

99.- Leo, M.A.; Sato, M. and Lieber, C.S.

"Effect of hepatic vitamin A deplection on the liver in humans and rats".

Gastroenterology, 1983; 84: 562 - 72.

100.-Lex, B.W.

"Alcohol problems in special populations".

En: Mendelson J.H., Mellow, N.K.(Ed.). The diagnosis and treatment of alcoholism. New York. Mc Graw-Hill International Book Co.

1985; 89 - 187

101.-Lieber, C.S.

"Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury".

N. Engl. J. Med., 1978; 298: 888 - 93.

102.-Lieber, C.S.

"Medical disorders of alcoholism: pathogenesis and treatment".

Philadelphia: W.B. Saunders. 1982.

103.-Lieber, C.S.

"Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury".

Acta Med. Scand., 1986; 703: 15 - 55.

104.-Lieber, C.S.

"Microsomal ethanol - oxidizing system".

Euzyme, 1987; 37: 47 - 56.

105.-Lieber, C.S.

"Biochemical and molecular basis of alcohol - induced injury to liver and other tissues".

N. Engl. J. Med., 1988; 319: 1639 -50

106.-Lieber, C.S.; Baraona, E.; Hernández Muñoz, R. et al.

"Impaired oxygen utilization: a new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates".

J. Clin. Invest., 1989; 83: 1682 - 90.

107.-Lieber, C.S. and De Carli, L.M.

"Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding".

Science, 1968; 162: 917 - 8.

108.-Lieber, C.S.; Nakano, M. and Worner, T.M.

"Ultrastructure of initial stages of hepatic perivenular fibrosis after alcohol.

Trans. Assoc. Am. Physicians., 1981; 94: 292 - 300.

109.-Lindenbaum, J. and Lieber, C.S.

"Hematological effect of alcohol in man in the absence of nutritional defeciency".

N. Engl. J. Med., 1969; 281: 233 - 8.

110.-Liu, J.K.

"Leukopenia in alcoholics".

Am. J. Med., 1973; 54: 605 - 10.

111.-Liu, J.K.

"Effect of alcohol in granulocytes and lymphocytes".

Sem. Hemat., 1980; 17: 130 - 6.

112.-Mackaness, G.B.

"The moncyte and cellular immunity".

Semin. Hematol., 1970; 7: 172 - 84.

113.-Matloff, D.S.; Selinger, M.J. and Kaplan, M.M.

"Hepatic transaminase activity in alcoholic liver disease".

Gastroenterology, 1980; 78: 1389 - 92.

114.-Matsuzaki, S. and Lieber, C.S.

"Increased suceptibility of hepatic mitochondrias to the toxicity acetaldehyde after chronic ethanol consumption".

Biochem. Biophys. Res. Commun, 1977; 75: 1059 - 65.

115.-Mc Gregor, R.R.; Gluckman, S.J. and Senior, J.R.
"Granulocyte function and levels of inmunoglobulins and complement in patients admitted for withdrawal from alcohol".
J. Infect. Dis., 1978; 138: 747 - 58

116.-Mc Keever, V.; O'Mahony, C.; Whelan, C.A. et al.
"Helper and suppressor T lymphocyte function in severe alcohol liver disease".
Clin. Exp. Immunol., 1985; 60: 39 - 48.

117.-Melchers, F. and Andersson, J.
"Factors controlling the B- cell cycle".
Annu. Rev. Immunol., 1986; 13 - 26.

118.-Meuer, S.C.; Acuto, O.; Hussey, R.E. et al.
"Evidence for the T_3 - associated 90-K heterodimer as the T- cell antigen receptor".
Nature, 1983; 303: 808 - 10.

119.-Meuer, S.C.; Fitzgerald, K.A.; Hussey, R.E. et al.
"Clonotypic structures involved in antigen -specific human T cell function: relationship to the T_3 molecular complex".
J. Exp. Med., 1983; 157: 705 - 19

120.-Meuer, S.C.; Hussey, R.E.; Cantrell, D.A. et al.
"Triggering of the T3-Ti antigen receptor complex result in clonal T- cell proliferation through an interleukin-2 dependent autocrine pathway".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1984; 81: 1509 -13.

121.-Meuer, S.C.; Hussey, R.E.; Fabbi, M. et al.
"An alternative pathway of T- cell activation: a functional role for the 50-Kd T_{11} sheep ertrocyte receptor protein".
Cell, 1984; 36: 897 - 906.

122.-Mezey, E.
"Metabolic effects of alcohol".
Fed. Proc., 1985; 44: 134 - 8.

123.-Mier, J.W. and Gallo, R.C.
"Purification and some characteristic of human T cell growth factor fron phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media".
Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 1980; 77: 6134-8.

124.-Muller, A. and Sies, H.
"Inhibitions of ethanol- and aldehyde- induced release of ethanol from isolated perfused rat liver by pargyline and disulfuram".
Pharmacol. Biochem. Behav., 1983; 28: 429 - 32.

125.-Nathan, C.F.

"Secretory produts of macrophages"

J. Clin. Invest., 1987; 79: 319 - 26.

126.-Natvig, J.B. and Kunkel, H.G.

"Immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes".

Adv. Immunol. 1973; 16: 1 - 27.

127.-Nathan, C.F.; Murray, H.W. and Cohn, Z.A.

"The macrophague as an effector cell".

N. Engl. J. Med., 1980; 303: 622- 6.

128.-Nathan, C.F.; Prendergast, T.J. and Wiebe, M.E.

"Activation of human macrophagues: comparison of others cytokines with interferon- gamma".

J. Exp. Med., 1984; 160: 600 - 5

129.-Nebert, D.W.; Adesni, K.M.; Coon, M.J. et al.

"The P_{450} gene superfamily: recommended nomenclature".

DNA, 1987; 6: 1 - 11

130.-Nomura, F. and Lieber, C.S.

"Binding of acetaldehyde to rat liver mocrosomas: enhancement after chronic alcohol consumptions".

Biochem. Biophys. Res. Commun, 1981; 100: 131 - 7

131.-Nouri-Aria, K.T.; Alexander, G.J.; Portmann, B.C. et al.

"T and B cell function in alcoholic liver disease".

J. Hepatol., 1986; 2: 195 - 207.

132.-Oppenheim, J.J. and Schecter, B.

"Lymphocyte Transformation".

In: Rose, N.R. and Friedman, H., Ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1980; 233-45.

133.-Osmond, D.G.

"Population dynamics of bone marrow B lymphocytes".

Immunol. Rev., 1986; 93: 103 - 24.

134.-Palazón Azorín, J.M.; Gómez Andrés, A.; Griñó Prieto, E. y cols.

"Detección de alcoholismo en un Hospital General".

Med. Clin., 1988; 90: 88- 9.

135.-Panés, J.; Parés, A.; Torres, M. et al.

"Evidence that zinz depletion may favour hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease".

H. Hepatol, 1985; 1: 300 -3.

136.-Paronetto, F.

"Immunologic factors in alcoholic liver disease".
Sem. Liv. Dis., 1981; 1: 232 - 43.

137.-Peña Yañez, A.; Gil Extremera, B.; Rico Irles, J. y cols.

"Estudio sobre la lactacidemia y su significación clínica. IV.Influjo de la sobrecarga oral de etanol y de etanol mas fenformina sobre la lactacidemia en sujetos sanos".
Rev. Clin. Esp., 1974; 135: 431 - 9.

138.-Pequinot, H.

"Cirrosis en Patología Médica".
Edit. Toray-Masson. Barcelona, 1982; 1242-57.

139.-Permanen, K.

"Validity of survey data on alcohol use".
In: Gibbins, R.J. Ed. Alcohol and Drug problems, Vol I. New York: Wiley. 1974; 1355-74.

140.-Pirrone, S.; Tosato, F.; Rossi, P. et al.

"Identification with monoclonal antibodies of T-cell subset in peripheral blood and ascitic fluid of patient with alcoholic hepatic cirrhosis".
Boll. Ist. Sieroter. Milan, 1985; 64: 52-4.

141.-Pokorny, A.P.; Miller, B.A.; and Kaplan, H.B.
"A paper-and-pencil questionnaire".
Am. J. Psychiatr. 1972; 129: 342-5.

142.-Porolla, T.; Hutteroth, T.H.; Meyer Zum Buschenfelde, K.H.
"Cellular cytotoxicity against antologous hepatocytes in alcoholic fatty liver of baboons".
Liver, 1984; 4: 117-21.

143.-Pugh, R.N.H.; Murray-Lyon, I.M.; Dawson, J.L. et al.
"Transection of the aesophagus for bleeding varices".
Br. J. Surgery., 1973; 60: 646-9.

144.-Raff, M.C.
"Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocites in mice".
Transplant. Rev., 1971; 6: 52-80.

145.-Raulet, D.H.
"Expression and function of interleukin-2 receptors on immature T thymocytes".
Nature, 1985; 314: 101-3.

146.-Raya Muñoz, J. y Peña Yañez, A.
"Alcoholismo agudo y crónico: problemas médicos" En Manual de Patología Médica: Pelaez Redondo,J. y Peña Yañez, A., Ed. Edit. Paz Montalvo. Madrid 1984. 6: 434-54.

147.-Reich, Th.
"Biologic marker studies in alcoholism".
N. Engl. J. Med., 1988; 318: 188-2.

148.-Reinherz, E.L.; Kung, P.C.; Breard, J.M. et al.
"T cell requeriment for generation of helper factor (s) in man: analysis of the subsets involved".
J. Immunol., 1980; 124: 1883-7.

149.-Reinherz, E.L.; Meuer, S.C., and Schlossman, S.F.
"Tne delineation of antigen receptors on human T lymphocytes".
Immunol. Today, 1983; 4: 5-8

150.-Reinherz, E.L. and Schlossman, S.F.
"The diferentiation and function of human T lymphocytes".
Cell, 1980; 19: 821-7.

151.-Reinhzer, E.L. and Schlossman, S.F.
"Regulation of the immune response - inducer and suppressor T- lymphocyte subsets in human beings".
N. Engl. J. Med., 1980; 303: 370-3.

152.-Rico Irles, J.
"Repercusiones somáticas del alcoholismo". En alcoholismo. Ed. SADEMI. Edit. Serproaga. 1988; pag. 43.

153.-Rico Irles, J.; Gil Extremera, B. y Torres Velasco, F.
"Lactacidemia: significación clínica".
Rev. Clin. Esp., 1974; 134: 403-11.

154.-Rosembloom, J.; Feldman, G.; Freundlich, B. et al.
"Inhibition of excessive scleroderma fibroblast collagen production by recombinanrt gamma-interferon: association with a coordinate decrease in types I an III procollagen messenger RNA levels".
Arthritis Reum., 1986; 29: 851-6.

155.-Rosenthal,A.S.

"Regulation of the immune response - role of the macrophague".

N. Engl. J. Med., 1980; 303: 370-3.

156.-Ross, G.D. and Wischester, R.J.

"Methods for enumerating lymphocyte population". In: Manual of clinical immunology. Rose N.R. and Friedman, H. Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.

1980; 213-28.

157.-Samgi a, T.S.; Makarov, N.N. and Novitski, E.V.

"The dynamics of laboratory indices during the treatmen of chronic alcoholism".

Lab. Delo., 1989; 8: 20-2.

158.-Savolainen, E.R.; Leo, M.A.; Timpl, R. et al.

"Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured Baboon liver myofibroblast".

Gastroenterology, 1984; 87: 777-87.

159.-Schlesinger, L.; Musson, R.A. and Johnston, R.B. Jr.
"Functional and biochemical studies of multinucleated giant cells derived from the culture of human monocytes".
J. Exp. Med., 1984; 159: 1289-94.

160.-Serralta, J. y Hernández, C.G.
"Diversidad de lesiones hepáticas en los alcoholico. Aspectos clinicos, bioquímicos y epidemiologicos".
Rev. Clin. Esp., 1982; 165: 183-7.

161.-Sewell, R.B.; Poston, L.; Wilkinson, S.P. et al:
"Abnormalities in the leucocyte sodiun pump in advanced cirrhosis".
Gastroenterology, 1981; 81: 676-80.

162.-Sharma, S.; Mehta, S.; Morgan, J. et al.
"Molecular cloning and expression of human B-cell growth factor gene in Escherichia coli".
Science, 1987; 235: 1489-92.

163.-Shaw, S. Jayatilleke, E.; Ross, W.A. et al.
"Ethanol-induced lipid peroxidation: potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine".
J. Lab. Clin. Med., 1981; 98: 417-24.

164.-Shaw, S.; Jayatilleke, E. and Lieber, C.S.
"Lipid peroxidation as a mechanism of alcoholic liver injury: role of iron mobilization and microsomal induction".
Alcohol, 1988; 5: 135-40.

165.-Sieff, C.A.
"Hematopoietic growth factors".
J. Clin. Invest., 1987; 79: 1549-57.

166.-Solomon, L.R.
"Evidence for the generation of transaminase inhibitor(s) during ethanol metabolism by rats liver homogenates: a potential mechanism for alcohol toxicity".
Biochem. Med. Metab. Biol., 1987; 38: 9-18.

167.-Stefanini, G.F.; Mazzetti, M.; Zunarelli, P. et al.
"In vivo effect of chronic ethanol abuse on membrane alpha glycoprotein of lymphocytes and immune response to various stimulating agents".
Alcoholism (NY), 1989; 13: 444-8.

168.-Stevens, V.J.; Fantl, W.J.; Newman, C.B. et al.
"Acetaldehyde adducts with hemoglobin".
J. Clin. Invest., 1981; 67: 361-9.

169.-Straus, B.; Berenyi, M.R.; Huang, J., et al.
"Delayed hypersensitivity in alcoholic cirrhosis"
Am. J. Dig. Dis., 1971; 16: 509-14.

170.-Tabakoff, B.; Hoffman, P.L.; Lee, J.M. et al.
"Diferences in platelet enzyme activity betewn alcoholics and non alcoholics".
N. Engl. J. Med., 1988; 318: 134-9.

171.-Thomas, E.D.; Ramberg, R.E.; Sale, G.E. et al.
"Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophague in man".
Science, 1976; 192: 1016-8.

172.-Tisman, G. and Herbert, V.
"In vitro myelosuppression ad immunosuppression by ethanol".
J. Clin. Invest., 1973; 52: 1410-4.

173.-Triger, D.R. and Wright, R.
"Hyperglobulinemia in liver deseases"
Lancet, 1973; I: 1494-6.

174.-Tuys, A. and Pequinot, G.
"Greater risk of ascitic cirrhosis in female in relation to alcohol consumption".
Inter. J. Epidem., 1984; 13: 53-7.

175.-Unanue, E.R. and Allen, P.M.
"The basic for the immunoregulatory role of macrophages and others accesory cells".
Science, 1987; 236: 551-7.

176.-Uribarrena, R.; Maortua, M.; Diaz de Rada, E. y cols.
"Subpoblaciones linfocitarias en pacientes con etilismo crónico".
Rev. Clin. Esp., 1980; 156: 431-4.

177.-Van Damme, J.; Opdenakker, G.; Simpson, R.J. et al.
"Identification of the human 26-KD protein, interferon-beta-2 (IFN-Beta$_2$) as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor".
J. Exp. Med., 1987; 165: 914-9.

178.-Vittal, S.B.V.; Dourdourekas, D.; Shobassy, N. et al.
"Immunoglobulin and autoantibody response in acute and chronic liver disease".
Am. J. Med., 1974; 57: 546-50.

179.-Vol'skii N.N.; Kashiakova, N.V. and Kozlov, V A.
"Effect of the superoxide radical on lymphocyte proliferation stimulated by a mitogen".
Tsitologiia 1988; 30: 898-902.

180.-Von Knorring, A.L.; Bohman, M.M.; Von Knorring, L. et al.
"Platelet M.A.O. activity as a biological marker in subgroups of alcoholism".
Acta Psychiatr. Scand., 1985; 72: 51-8.

181.-Waring, A.J.; Rottenberg, H.; Ohnishi, T. et al.
"Membranes and phospholipids of liver mitochondria fron chronic alcoholic rats are resistant to membrane disordering by alcohol".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981; 78: 2582-6.

182.-Watson, R.R.; Jackson, J.C.; Hartmann, B. et al.
"Cellular immune function, endorphins and alcohol consumption in males".
Alcoholism (N.Y.), 1985; 9: 248-54.

183.-Watson, R.R.; Mosh, M.E.; Eskelson, C. et al.
"Identification of alcohol abuse and alcoholism with bioligical parameters".
Alcoholism (N.Y.), 1986; 10: 364-85.

184.-Weis, M.J.; Daley, J.F.; Hodgdon, J.C. et al.
"Calcium dependency of antigen-specific (T_3-Ti) and alternative (T_{11}) pathway of human T-cell activation".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984; 81: 6836-40.

185.-Whitehead, T.P.; Clarke, G.A. and Whitefield, A.G.V.
"Biochemical and haematological markers of alcohol intake".
Lancet, 1978; I: 978-81.

186.-Wickramasinghe, S.N.; Gardner, B. and Barden, G.
"Cytotoxic protein molecules generated as a consequence of ethanol metabolism in vitro and in vivo".
Lancet, 1986; II: 823 - 6

187.-Wilson, J.S.; Korsten, M.A. and Lieber,C.S.
"The combined effects of protein deficiency and chronic ethanol administration on rat ethanol metabolism".
Hepatology, 1986; 6: 823-9.

188.-Williams, A.J.K. and Barry, R.E.
"Free radical generation by neutrophils: a potential mechanism of cellular injury in acute alcoholic hepatitis".
Gut, 1987; 28: 1157-61.

189.-Yamada, S.; Mak, K. M. and Lieber, C.S.
"Chronic ethanol consumption alters rat liver plasma membranes and potentiate release of alkaline phosphatase".
Gastroenterology, 1985; 88: 1799-806.

190.-Yancopoulos, G.D. and Alt, F.W.
"Regulation of the assembly and expression of variable- region genes".
Annu. Rev. Immunol., 1985; 3: 159-95.

191.-Yokota, T.; Otsuka, T. and Mosmann, T.
"Isolation and characterization of a human interleukin CDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell and T-cells- stimulating activities".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1986; 83: 5894-8.