

2 of 3
11262
RECEIVED
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION**

Programa Universitario de Investigación Clínica

**"RESPUESTA DE FASE AGUDA EN
CIRROSIS HEPATICA EXPERIMENTAL"**

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de:
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

p r e s e n t a

Dr. Juan Garduño Espinosa



Asesor de Tesis:

DR. ALBERTO LIFSHITZ G.

MEXICO, D. F.

1988

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE :

	página
I. Resumen	iv
II. Antecedentes	1
1.- Respuesta de Fase Aguda	2
2.- Respuesta de Fase Aguda y cirrosis hepática ..	11
3.- Modelo experimental de cirrosis hepática	18
III. Justificación	20
IV. Planteamiento del problema	21
V. Hipótesis	22
VI. Objetivos	22
VII. Material y métodos	23
1.- Diseño de la investigación	23
2.- Descripción de la muestra	26
3.- Definición de las variables	26
4.- Técnicas de medición	28
5.- Análisis estadístico	35
VIII Resultados	38
1.- Factor Activador de Linfocitos	38
2.- Zinc y cobre	39
3.- Fagocitosis	41

4.- Tablas y gráficas	43
IX. Discusión	68
Apéndice 1.	
Estudio piloto	79
Apéndice 2.	
Indice de tablas y graficas	84
X. Bibliografía	87

I. RESUMEN :

La Respuesta de Fase Aguda (RFA) constituye un conjunto sistematizado de reacciones del huésped ante un evento agresor que genere cualquier tipo de proceso inflamatorio. Este sistema parece ser de valor para la supervivencia. En la cirrosis hepática suele observarse una RFA disminuida en intensidad. Un modelo experimental de cirrosis se obtiene a través de la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas.

En el presente trabajo se describen algunas de las características de la RFA en ratas sanas y en ratas con daño hepático, tanto en estado basal como en condiciones de inflamación. Las variables estudiadas fueron : El Factor Activador de Linfocitos, niveles séricos de cobre y un aspecto del proceso de fagocitosis.

En el grupo de ratas sanas sin inflamación se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de zinc y aumento igualmente significativo en los niveles de cobre en el suero con respecto al grupo de ratas con daño hepático sin inflamación. En el grupo de ratas sanas con inflamación se hizo evidente la presencia del Factor Activador de Linfocitos, disminuyó el nivel sérico de zinc, aumentaron los niveles en el suero del cobre y la función fagocítica fue manifiesta. Cuando las ratas con daño hepático se sometieron a un proceso inflamatorio presentaron una RFA menos intensa pero no diferente desde el punto de vista estadístico respecto al grupo de ratas sanas. En el caso del Factor Activador de Linfocitos esta diferencia se manifestó como una tendencia a tener valores menores en el grupo de ratas

con daño hepático con inflamación con respecto al grupo de ratas sanas con inflamación. Los valores de zinc y cobre séricos fueron similares entre el grupo de ratas sanas con inflamación y los grupos de ratas con daño hepático tanto con inflamación como sin ella. En lo relativo a la fagocitosis no se observó ninguna diferencia entre los grupos de ratas sanas y con daño hepático. Concluimos que en la rata con daño hepático y con actividad inflamatoria se presenta la Respuesta de Fase Aguda con menor intensidad con respecto a la rata previamente sana en la que se agrega un estímulo inflamatorio similar.

II. ANTECEDENTES

Una de las características inherentes al proceso de la vida ha sido la capacidad de adaptación. Las especies no solamente han tenido que mostrar esta forma de respuesta a las características cambiantes del medio ambiente en épocas de crisis, también han debido desarrollar formas de responder individualmente a las agresiones cotidianas provenientes de un habitat, por lo demás, estable.

Una manera de responder a un medio perennemente hostil y que ha sido claramente identificado en los seres humanos y en algunas otras especies es la de el "stress", concepto que tiene sus antecedentes en Claude Bernard quién consideró que la enfermedad ocurría como un resultado de una insuficiente capacidad de adaptación del organismo ante los agentes agresores provenientes del medio ambiente. El concepto en si, sin embargo, fué propuesto por el fisiólogo Hans Selye con un significado que en términos biológicos hace referencia a la interacción entre fuerzas ó estímulos externos y aquellas propias del organismo. De la magnitud de la fuerza externa y la capacidad del organismo para tolerarla dependerá el restablecimiento de la homeostasis o bien una ruptura capaz de conducirlo a la muerte (1-2).

La observación inicial de Selye ocurrió en Praga cuando era estudiante de Medicina y se fundamentó en el hecho de que los pacientes con una amplia variedad de enfermedades cuando eran admitidos al Hospital parecían tener los mismos síntomas. Años

después Selye teorizó que independientemente de la causa que produjera una alteración en el organismo, la reacción fisiológica era la misma y a dicho conjunto de respuestas las agrupó bajo la denominación de Síndrome General de Adaptación, reconociendo la importancia del sistema endócrino como iniciador y regulador de la misma (1-3)

La Respuesta General de adaptación se caracteriza por presentar tanto cambios tempranos como tardíos, los que se presentarán dependiendo de la persistencia y magnitud del estímulo (1-3).

La identificación de las características propias de los cambios tempranos ha permitido formular la teoría de que dichos cambios ocurren en forma sistemática y ordenada debido a que son regulados por una molécula con múltiples funciones, orientadas todas ellas a mejorar la capacidad de respuesta del organismo cuando se enfrenta a una agresión.

1.- Respuesta de Fase Aguda .-

A este conjunto de reacciones sistematizadas del huésped que son inducidas por la invasión microbiana, el daño de los tejidos, las reacciones inmunológicas y otros procesos inflamatorios se le ha denominado "Respuesta de Fase Aguda" (RFA). (4-5).

Desde una perspectiva teórica, esta respuesta, en su conjunto, se dirige a mejorar la capacidad del huésped para superar el evento agresor y de este modo contribuye a su adaptabilidad al medio ambiente y a aumentar las posibilidades de sobrevivencia de una especie.

Una de sus características principales es la de ser una reacción generalizada, independientemente de que la enfermedad o el estímulo agresor inicial sean localizados o sistémicos. Suele observarse en las primeras horas o días después del evento desencadenante, aún cuando algunos de sus rasgos se pueden presentar en forma crónica señalando una enfermedad persistente (6-7).

En forma general, la RFA se expresa en forma inmediata en personas con infecciones bacterianas, quemaduras y traumatismos múltiples; sin embargo, pueden observarse cambios característicos de la RFA en enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria crónica del intestino. Asimismo, se han observado características de la RFA en forma temprana en enfermedades malignas tales como el cáncer de células renales, la enfermedad de Hodgkin y las neoplasias metastásicas del hígado (4)(7).

La RFA se manifiesta por modificaciones en las funciones metabólicas, endocrinas, neurológicas e inmunológicas y su espectro se caracteriza principalmente por un aumento explosivo en la síntesis de algunas proteínas hepáticas, por leucocitosis a expensas de neutrófilos inmaduros circulantes, disminución en los niveles séricos de hierro y de zinc, aumento en los niveles séricos de cobre, el balance nitrogenado se torna negativo y se presentan anemia y fiebre (4)(7).

Se ha propuesto que esta compleja serie de eventos se inicia y se coordina a través de un polipeptido que actúa como mediador y

al que se ha denominado interleucina 1 (IL-1).(4)(8.9)

Existen indicios que apoyan el valor adaptativo que para la supervivencia tiene este factor, ya que se le ha encontrado practicamente en todos los niveles de la escala evolutiva : asi, las estrellas de mar, los peces, los lagartos, el ratón, el conejo y el hombre producen una substancia con características de IL-1, lo que ha permitido suponer que regula respuestas muy primitivas en relación al tiempo y con un largo devenir filogenético (8)(10).

La IL-1 se produce por los fagocitos mononucleares activados, llegándosele a considerar como una verdadera hormona, en virtud de su acción sobre sistemas orgánicos distantes, a los que llega a través de la circulación (4)(11)

Las células productoras de IL-1 son fundamentalmente los monocitos sanguíneos y, en menor proporción, las células fagocíticas del hígado y del bazo, así como otras células, tales como los queratinocitos, células epiteliales y gingivales, células mesangiales renales, células gliales y astrocitos cerebrales. Estas células son estimuladas para sintetizar y liberar IL-1 a partir de practicamente cualquier infección, reacción inmunológica u otro proceso inflamatorio (6)(12-16).

Para explicar la producción de IL-1 se ha argumentado un daño directo sobre el monocito, el cual puede ser provocado por una gran variedad de substancias, lo que origina como respuesta una síntesis elevada de diversas proteínas por parte de la célula y entre las que se incluye a la IL-1 (17). Además, esta síntesis parece ocurrir en forma inmediata a la presentación del estímulo,

ya que se ha informado que la IL-1 no se encuentra preformada ni almacenada, y su síntesis parece depender de que se le induzca, si bien la cantidad en que se produce depende del estado de maduración y de activación de la célula. Esta característica es universal a las células mononucleares ya que al parecer no se relaciona con alguna subpoblación en particular (18-20).

Si bien la caracterización proteica de la IL-1 no parece arrojar dudas, no se ha dilucidado con precisión si la molécula se encuentra glucosilada o si tiene además un elemento lipídico en su estructura (11)(21-30).

Se ha considerado que la IL-1 se sintetiza y se libera en forma de precursor de alto peso molecular, el que después es convertido a una forma activa por un sistema de proteasas (31-32).

El término IL-1 se propuso en 1979, en el Taller Internacional de Linfocinas, celebrado en Ermatingen, Suiza, para describir a un conjunto de factores que podrían conformar una sola molécula, tales como el Pirógeno Endógeno (PE), el Mediador Endógeno Leucocitario (MEL), el Factor Activador de Linfocitos (FAL), el Factor de Células Mononucleares (FCM), el Factor de Proliferación de Timocitos (FPT), etc., o bien, que podrían constituir una familia de moléculas relacionadas entre sí (4)(7)(9)(33).

Las investigaciones originales en relación con la producción de factores solubles por parte del huésped en la RFA parecen derivar del trabajo de Menkin en 1943. Se pensaba entonces que la fiebre se producía a causa de un factor soluble al que se le denominó pirógeno granulocítico. En 1948, Beeson y Bennett encuentran en la

sangre de conejos febriles una proteína similar a la que denominan PE. En 1960, Atkins y Wood demuestran que el pirógeno granulocítico y el PE son la misma sustancia y documentan su poca especificidad de especie. Para 1970, se había establecido la importancia del PE como mediador de la respuesta febril (6)(7)(26)(34-38)

Durante la década de los setentas, diversos investigadores hacen evidente la similitud entre los diversos componentes de la IL-1, sin embargo, persisten aspectos que indican, que estos factores son diferentes proteínas o que, por lo menos, tienen algunas diferencias (39-46).

La IL-1 parece actuar a través del ionóforo de calcio, ya que esta sustancia reproduce varias de las actividades biológicas de aquella. Este ionóforo transporta cationes divalentes a través de las membranas celulares causando un incremento rápido en los niveles de calcio intracelular. De este modo, la IL-1 actuaría sobre las células por medio de un aumento inespecífico de los niveles intracelulares de calcio, los cuales a su vez activan a las fosfolipasas de membrana, produciendo con ello la liberación de ácido araquidónico, que a su vez proporciona el sustrato, independientemente de la vía metabólica de oxidación que vaya a ser utilizada. Las prostaglandinas y los leucotrienos producidos constituyen entonces la segunda señal para la activación celular. Aún cuando la fiebre y la proteólisis muscular se relacionan con un aumento en la síntesis de prostaglandinas a través de la vía de la ciclo-oxidación, otras funciones, tales como la degranulación

de neutrófilos y la activación de linfocitos, parecen ocurrir por medio de la vía de la lipo-oxigenasa (11)(47-62).

Factores inhibitorios : En 1976 Sorg y Geczy describieron un grupo de factores con carácter de anticuerpos contra linfocinas. A partir de entonces, se han caracterizado anticuerpos contra IL-1, en forma de actividad anti-PE y anti-FAL, los que, cuando se agregan al cultivo de células mononucleares humanas durante las primeras 24 horas, previenen la síntesis de estos factores "in vitro" (63-64).

A la fecha se han descrito una gran variedad de factores que impiden la actividad de la IL-1 o de algunos de sus componentes (6)(7)(25)(36)(65-71).

Efecto sobre los cationes divalentes :

Zinc: Este catión es un nutriente esencial para el crecimiento bacteriano, ya que se incorpora en diferentes proteasas, así como en algunas polimerasas y transcriptasas de ácidos nucleicos; además de que constituye un elemento normal en los ribosomas y en las membranas microbianas. Estos hechos apoyan el argumento de que la disminución del zinc en los niveles plasmáticos del huésped podría contribuir a aumentar la resistencia del mismo ante la infección (72-73).

Cobre : El cobre presenta niveles plasmáticos elevados durante la RFA. Este fenómeno se relaciona con el hecho de que el cobre cumple funciones en el sistema inmune, ya que cuando hay deficiencia del mismo, se presenta una disminución de las células

productoras de anticuerpos. Se ha asociado una disminución en los niveles plasmáticos de cobre con un aumento en la mortalidad por infecciones por salmonella (72). En adultos esta deficiencia se ha relacionado con infecciones bacterianas recurrentes. El mecanismo propuesto para explicar estos trastornos se basa en la disminución de las enzimas dependientes de cobre, como son la dismutasa de superóxido y la citocromo c oxidasa; además, recientemente se ha descrito que el cobre posee propiedades antiinflamatorias. La IL-1 parece incrementar los niveles de cobre en el plasma a través de la estimulación de la síntesis de ceruloplasmina por el hígado. En esta molécula se han localizado radicales de oxígeno libre, producidos por los neutrófilos e inducidos por la IL-1, probablemente, como un factor de defensa agregado a los señalados previamente (7)(72).

Efecto sobre los leucocitos :

Entre las respuestas más rápidas a la IL-1 se encuentra la liberación de neutrófilos inmaduros a la sangre. Esta se debe aparentemente a la acción directa de la IL-1 sobre la médula ósea. Los neutrófilos así liberados presentan un incremento en su actividad metabólica (48)(51)(74-75).

Se ha demostrado que el PE altera la membrana celular de los neutrófilos, produciendo un aumento del metabolismo oxidativo y de la degranulación, que parecen no estar mediados por vía de las prostaglandinas (51).

Kampschmidt y Upchurch, mediante la administración repetida de

PE, encontraron que aumentaba el número de leucocitos circulantes. Un hecho similar ocurrió con la administración de MEL en forma reiterada. En forma característica la administración de PE produce inicialmente neutropenia, seguida entre 1 y 2 horas después de neutrofilia. Este tipo de respuesta se presenta también en forma consistente cuando se inyecta C5a. Ambos factores son capaces, además, de estimular el metabolismo oxidativo del neutrófilo (39)(48)(74).

Con objeto de identificar la presencia de IL-1 en seres humanos se han llevado a cabo estudios tanto en condiciones normales como patológicas. En voluntarios humanos sanos y en reposo no se ha logrado determinar IL-1 o sólo se ha detectado en pequeñas cantidades. Sin embargo, se han encontrado niveles elevados de PE, FAL y de MEL en el plasma de individuos normales después del ejercicio intenso (4)(7).

En voluntarios humanos a quienes se les ha administrado endotoxina, no ha sido posible detectar IL-1 circulante, probablemente por factores inhibitorios (32a).

En pacientes con fiebre, no ha sido posible aislar PE, quizá debido a la baja sensibilidad de la prueba del pirógeno en el conejo. Se ha detectado, sin embargo, un incremento en la actividad del MEL en pacientes con enfermedad inflamatoria granulomatosa (4)(7)(11)(32a). Un péptido de bajo peso molecular, denominado factor inductor de proteólisis y que pudiera corresponder a un fragmento de IL-1 ha sido aislado de pacientes con septicemia (76).

En un estudio realizado en recién nacidos, se encontró que un grupo presentaba disminución en la producción de PE cuando se realizaba la estimulación de sus monocitos. Consistentemente los niños con esta característica habían nacido por medio de cesárea electiva, lo que sugiere que factores presentes durante el parto normal pudiesen tener un papel importante en la formación de IL-1 (68).

En la sarcoidosis pulmonar, que es una enfermedad crónica caracterizada por la presencia de granulomas y alveolitis, se ha encontrado una relación directa entre la actividad de la enfermedad y la liberación de IL-1 por los macrófagos pulmonares en un nivel más alto cuando se asocia con una alveolitis marcada, que cuando la alveolitis es de baja intensidad (13). En pacientes con esclerosis sistémica progresiva se ha detectado actividad de IL-1 y se ha detectado actividad compatible con MEL en pacientes con diarrea bacteriana, paludismo y septicemia (11)(77).

Hay evidencias de la presencia de IL-1 en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y en pacientes con osteoartritis (4)(7)(32a).

En pacientes con glioblastoma, en los cuales prevalece un estado de inmunodeficiencia celular, se demostró que cultivos de estas células tumorales secretan un factor similar a la IL-1, además de un factor que inhibe a la IL-2 lo que produce un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células T y sobre la inducción de células T citotóxicas (12).

Bodel y Rawline han demostrado la liberación de PE en cultivos

de células con hipernefomas y de células esplénicas de pacientes con enfermedad de Hodgkin (6)(50).

En forma reciente se ha descrito una relación inversamente proporcional en el crecimiento tumoral entre niveles incrementados de complejos inmunes circulantes y la producción disminuida de IL-1 y de IL-2. Este decremento en los niveles de interleucinas fue progresivo conforme al crecimiento del tumor y se acentuó marcadamente cuando se presentaron metástasis (78).

Se ha descrito una insuficiente formación de IL-1 en pacientes con desnutrición y en aquellos con carcinomas de gran tamaño (4). Se ha propuesto que la enfermedad periodontal podría estar condicionada por la liberación de IL-1 desde las células gingivales (79). En un informe reciente se reporta un aumento en la producción de IL-1 en animales a los que se les administró ciclosporina (80).

2.- Respuesta de Fase Aguda y Cirrosis Hepática :

Se define a la cirrosis hepática como un estado cicatricial que incluye todas las formas de enfermedad hepática crónica difusa y que se caracteriza morfológicamente por una pérdida extensa de células hepáticas y de una combinación de nódulos hepatocíticos de regeneración con tejido conectivo septal (81-82).

La Asociación Internacional para el estudio del hígado clasificó la cirrosis en :

1.- Alcohólica, 2.- Postnecrótica, 3.- Biliar, 4.- Por hemocromatosis, 5.- Cardíaca y 6.- De etiología desconocida (83).

Desde el punto de vista histopatológico, se han descrito tres esquemas morfológicos fundamentales : a.- cirrosis septal micronodular, b.- cirrosis macronodular y c.- de caracteres mixtos o macronodular incompleta (84).

La cirrosis hepática es un problema de salud pública y constituye una de las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como subdesarrollados (85-89).

La infección se presenta con una frecuencia aumentada en pacientes con cirrosis alcohólica (90-97). Existen diversos factores que explican esta susceptibilidad, entre los que se incluyen alteraciones de la función granulocítica, así como en la inmunidad humoral y celular, que predisponen al paciente tanto a la infección producida por bacterias piógenas como a enfermedades granulomatosas como es el caso de la tuberculosis (90).

Esta disminución en la resistencia a la infección se asocia frecuentemente con entidades tales como la peritonitis bacteriana espontánea y con infecciones pulmonares y de las vías urinarias. En forma menos frecuente se mencionan la meningitis bacteriana y la septicemia estafilocócica secundaria a infecciones de la piel que son producidos a su vez por las punciones venosas. Otros factores que contribuyen a esta predisposición son la incapacidad para movilizar las secreciones respiratorias y la colocación de catéteres y sondas, fundamentalmente uretrales (90).

El síndrome de peritonitis bacteriana espontánea descrito

inicialmente por Conn se presenta en aproximadamente 8% de los pacientes con ascitis secundaria a la cirrosis. Los microorganismos generalmente encontrados son E coli, S pneumoniae, N meningitidis y otras bacterias entéricas (98-99).

En la colocación del catéter de LeVeen en el paciente con cirrosis y ascitis se ha identificado la presencia de infección como un riesgo importante y se ha reconocido su importancia en el sentido de que conduce a septicemia de curso fatal; incluso se recomienda la administración de antibióticos profilácticos (100).

Se ha encontrado endotoxemia en forma frecuente en el paciente con cirrosis, aparentemente debido a un insuficiente aclaramiento de esta sustancia por parte del hígado (95)(97).

La progresión de la enfermedad hepática, independientemente de la suspensión de la ingestión del alcohol, en el caso de la cirrosis hepática por alcohol, ha sugerido la posibilidad de que la alteración en la inmunidad humoral y celular pudiera participar en la patogenia de la enfermedad. En conjunto las anomalías encontradas comprenden : 1.- La reducción en el número de células T circulantes. 2.- Aumento en el número de células T dentro del hígado. 3.- La producción de linfocinas como respuesta a la exposición de material hialino y 4.- Aumento en la citotoxicidad espontánea mediada por células. Se ha encontrado además una alteración en la quimiotaxis de los neutrófilos, independientemente del consumo de alcohol en forma reciente (90). Un hecho adicional es la determinación de niveles elevados del factor inhibidor de la quimiotaxis, lo que se ha supuesto influye

en la susceptibilidad de estos pacientes a la infección (90)(96).

Entre las alteraciones de la inmunidad humoral en los diferentes tipos de cirrosis se encuentran : 1.- hipergammaglobulinemia, 2.- anticuerpos contra el material hialino, 3.- anticuerpos contra las proteínas de la bilis, 4.- anticuerpos contra el DNA de doble cadena y 5.- detección de complejos inmunes circulantes en cuya estructura se ha identificado IgA (90).

Se han propuesto dos mecanismos que tratan de explicar estas alteraciones :

1.- Que se deben a un aclaramiento deficiente de antígenos bacterianos o de la dieta y 2.- Que existe una pérdida de la actividad de regulación de las células T o bien, una activación independiente de esta regulación por parte de las células B (90).

En la enfermedad hepática crónica se han observado alteraciones en subpoblaciones de linfocitos los que se ha supuesto podrían ser debidos a trastornos en los índices de recambio o bien, a secuestro en diferentes órganos. En el hígado se observa infiltración linfocitaria, básicamente a expensas de linfocitos T (101-103). Se ha especulado que la secreción de linfocinas por parte de estas células, tales como factores fibrógenicos y citotóxicos, podrían tener participación en la evolución de la hepatitis alcohólica hacia la cirrosis (104).

La inmunidad celular en el paciente con cirrosis hepática se encuentra deprimida, encontrándose incluso una relación inversamente proporcional entre el grado de respuesta inmune

celular y la severidad de la enfermedad hepática (105).

El hecho de que la inmunidad mediada por células se derive del efecto de sustancias solubles liberadas por los linfocitos sensibilizados y la observación de que estas linfocinas pueden inducir fibrosis ha sugerido la posibilidad de que los cambios en el tejido conectivo que ocurren en el hígado, podrían ser debidos a la mediación de estas moléculas sintetizadas y liberadas localmente (106-107).

Se ha sugerido que el desarrollo de la cirrosis en alcohólicos puede llevarse a cabo con una mínima participación de reacción inflamatoria. Así, la fibrosis perivenular considerada como un posible paso inicial de la fibrosis pericelular en el desarrollo de la cirrosis alcohólica, se presenta sin datos de inflamación significativa. Adicionalmente, se sabe que el alcohol causa inhibición de la fagocitosis por parte de los leucocitos e impide la liberación de mediadores de la inflamación a partir de los mastocitos (96)(106)(109).

Síntesis de proteínas en cirrosis hepática : Se encuentra aumentada la síntesis de fibrinógeno y de otras proteínas de fase aguda en condiciones basales. A su vez, los niveles séricos de albúmina y de transferrina se encuentran disminuidos; de hecho, éstos constituyen un indicador de progresión en la insuficiencia hepática crónica (88)(92). El alcohol, por sí mismo, produce una disminución en la síntesis de factores del complemento. Su ingestión, independientemente de inhibir la síntesis proteica,

causa una alteración en la secreción de las mismas a la sangre. Estos efectos han sido explicados por cambios en el potencial redox debidos a la oxidación del etanol o bien, como debidos a la unión del acetaldehído a las proteínas o a los aminoácidos. Además, el etanol inhibe sistemas de transporte activo de los mismos aminoácidos (85). En los pacientes con cirrosis alcohólica se presenta un aumento policlonal de inmunoglobulinas, a expensas de una elevación desproporcionada de los niveles de IgA y de IgG, constituyendo, esta última, un factor pronóstico de progresión y evolución rápida de la enfermedad, en relación directa con su incremento (90)(102)(110-111).

Leucocitosis :

La leucopenia es una característica frecuente, asociada a la enfermedad hepática crónica por alcohol, la cual tiende a ser progresiva cuando se agrega una infección (96). La cuenta leucocitaria, frecuentemente se ubica en valores inferiores a 5000 células/mm³; las cifras mayores a 10.000 células suelen acompañar a la insuficiencia hepática fulminante (92). Los pacientes con cirrosis en los que se asocia ascitis son también frecuentemente leucopénicos, por lo que en ellos cifras de leucocitos entre 10.000 y 12.000 células suelen tener un significado clínico importante (85). Se ha señalado que el incremento en la marginación y en la adherencia que muestran los granulocitos después de la ingestión de alcohol podría explicar la granulocitopenia en pacientes alcohólicos (90). Por otro lado, uno

de los datos más constantes en la hepatitis alcohólica es la presencia de leucocitosis (104).

Cationes divalentes : Se presenta un exceso de hierro en mayor o menor grado en todos los pacientes con cirrosis. El hierro puede encontrarse depositado en el hígado exclusivamente o en otros varios tejidos. Se ha sugerido que el almacenamiento del hierro puede estar disminuido en el hígado en el periodo inicial de la enfermedad y que tendería a estar elevado sólo hacia las etapas finales de la misma (112).

Zinc : La concentración de zinc en alcohólicos disminuye aparentemente a expensas de pérdidas urinarias incrementadas, aún cuando se sabe que niveles bajos de zinc suelen acompañar a niveles disminuidos de albúmina (85)(89)(113).

Anemia : En el paciente con cirrosis hepática la anemia es una condición frecuente, la cuál puede ser microcítica a causa de pérdidas sanguíneas, macrocítica por deficiencia de ácido fólico o mixta como consecuencia de niveles disminuidos de hierro y ácido fólico (92)(114).

Catabolismo : Los pacientes con enfermedad hepática crónica con frecuencia presentan un balance nitrogenado negativo, fundamentalmente aquellos con un estadio avanzado de la enfermedad, aún cuando no se ha encontrado correlación con la severidad de la misma (105).

Fiebre : Se ha observado febrícula hasta en el 30 % de pacientes

con enfermedad hepática alcohólica (85)(96). Sin embargo, es también una experiencia clínica corriente la presencia de hipotermia en fases avanzadas de la encefalopatía hepática, y se ha descrito que aún en presencia de infección, el paciente con cirrosis hepática evoluciona con temperatura normal o disminuida (99)(85).

3.- Modelo Experimental de Cirrosis Hepática :

En la búsqueda de un modelo experimental aceptable para la cirrosis hepática humana se han ensayado diversos agentes en varias especies animales. Entre estas, se encuentran distintas especies de primates, la rata y el ratón. El modelo que actualmente se piensa reproduce mejor la enfermedad humana es el que se ha generado en el babuino (mono africano de la familia de los cercopitécidos), en el cual se ha empleado como agente inductor de la enfermedad, el etanol (115-118).

Un modelo de mayor accesibilidad lo constituye la rata, en la cual se ha ensayado la administración oral de etanol, intentando con ello reproducir con mayor fidelidad la enfermedad humana, al administrar el agente del cual se sospecha la mayor participación etiológica. Sin embargo, el hecho de que la rata tenga una aversión natural para la ingestión del alcohol dificulta su utilización (116)(119-122).

Una alternativa de modelo en la rata y otras especies es la generación de cirrosis por medio de la administración de

tetracloruro de carbono (CCl₄). Este compuesto forma parte de las llamadas hepatotoxinas directas, las cuales se ha comprobado provocan necrosis centrolobulillar y esteatosis en el hombre y en los animales de experimentación (123). Son Cameron y Karunaratne en 1936 quienes establecen las condiciones de este modelo experimental. Las principales lesiones histológicas que se presentan: la esteatosis y la necrosis se desarrollan por vías independientes, conociéndose mejor la vía patogénica de la esteatosis, la cual se debe a la dificultad en la salida de los triglicéridos del hígado a causa de una alteración en el acoplamiento de los triglicéridos a la apoproteína transportadora. El mecanismo de la necrosis hepática no es tan claro, se han propuesto los siguientes: La acción de un metabolito, un radical libre que pudiera corresponder al CCl₃, que provocaría la peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas celulares; la liberación de enzimas hidrolíticas a partir de los lisosomas lesionados; la pérdida de una fuente apropiada de energía celular, debido a la lesión de sus mitocondrias; el efecto pernicioso de la acumulación de iones Ca⁺⁺, sobre el metabolismo celular y finalmente el caos metabólico producido por la pérdida de enzimas y coenzimas del citoplasma (123-124).

Si bien exista incertidumbre en cuanto al grado en que este modelo animal puede extrapolarse inferencialmente a la cirrosis hepática humana, es claro que, aunque no comparten el agente etiológico sospechado, guardan una gran similitud en sus características bioquímicas e histológicas (124).

III. JUSTIFICACION :

La Respuesta de Fase Aguda es un conjunto sistematizado de reacciones del huésped ante un evento agresor que genere cualquier tipo de proceso inflamatorio. Este sistema coordinado de respuestas defensivas parece ser de valor para la supervivencia, siendo regulado por un polipéptido denominado interleucina 1 (IL-1).

En la cirrosis hepática suele observarse una Respuesta de Fase Aguda disminuida en intensidad; No está claro si esto se debe a múltiples factores aislados entre si o bien si es una consecuencia de una alteración en el desencadenamiento o coordinación de la misma.

El presente trabajo se encuentra inmerso dentro de dos grandes preguntas. Primero, si la observación clínica está traduciendo un hecho real y segundo, si la RFA realmente está alterada, si esto se relaciona con una disminución en los efectos atribuidos a la IL-1.

Dado lo complejo de los problemas expuestos nos propusimos iniciar su exploración en un modelo experimental en ratas con el objetivo de determinar si los niveles de algunos de los elementos involucrados en la RFA en ratas con daño hepático son diferentes de los obtenidos en un grupo de ratas sanas cuando ambos grupos son sometidos a un estímulo inflamatorio.

IV. Planteamiento del problema :

La Respuesta de Fase Aguda constituye un mecanismo adaptativo que le permite a un huésped responder a una gran variedad de estímulos agresores.

En la cirrosis hepática humana parece observarse una Respuesta de Fase Aguda alterada en algunos de sus componentes.

El modelo experimental en ratas a las que se produce daño hepático por medio de la administración de tetracloruro de carbono reproduce algunos de los caracteres bioquímicos e histológicos de la enfermedad humana.

En ratas con insuficiencia hepática experimental en las que se ha agregado un proceso inflamatorio

Se produce una Respuesta de Fase Aguda diferente a la que se presenta en ratas sanas sometidas al mismo proceso inflamatorio ?

V.- HIPOTESIS :

Las ratas con daño hepatocelular inducido experimentalmente reaccionan a un estímulo inflamatorio con una Respuesta de Fase Aguda diferente a la observada en un grupo de ratas previamente sanas.

VI. OBJETIVOS :

- 1.- Medir "in vitro" la producción de interleucina 1 a través del Factor Activador de Linfocitos mediante el ensayo de proliferación de timocitos tanto en ratas sanas como en ratas con daño hepatocelular en las que se ha producido un proceso inflamatorio.
- 2.- Medir los niveles séricos de cobre y de zinc en un grupo de ratas sanas y en un grupo de ratas con daño hepatocelular tanto en condiciones de inflamación como sin ellas.
- 3.- Determinar la función de los macrófagos en un aspecto de la fagocitosis a través de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio tanto en ratas sanas como en ratas con daño hepatocelular sometidas a un estímulo inflamatorio.

VII. MATERIAL Y METODOS :**1.- Diseño de la Investigación :**

Experimento.

1.1 Tipo de diseño experimental :

Diseño factorial 2 X 2

Diseño de comparación simple

1.1.1 Diseño factorial :

El diseño factorial se utilizó en el caso del objetivo 2 (ver objetivos). El establecer este tipo de diseño se basó en el hecho de que se tenían 2 variables independientes, las cuáles podrían tener entre si un efecto de interacción. Cada una de estas variables se encontraba en un nivel nominal de medición, divididas a su vez en dos categorías. (gráfica A)

Variables independientes :

1.- daño hepatocelular : a.- presente

b.- ausente

2.- Inflamación : a.- presente

b.- ausente

VARIABLES DEPENDIENTES :

- 1.- Nivel sérico de zinc
- 2.- Nivel sérico de cobre

GRUPOS DE ESTUDIO :

- grupo I .- ratas sanas sin inflamación
- grupo II .- ratas sanas más inflamación
- grupo III.- ratas con daño hepatocelular sin inflamación
- grupo IV .- ratas con daño hepatocelular más inflamación

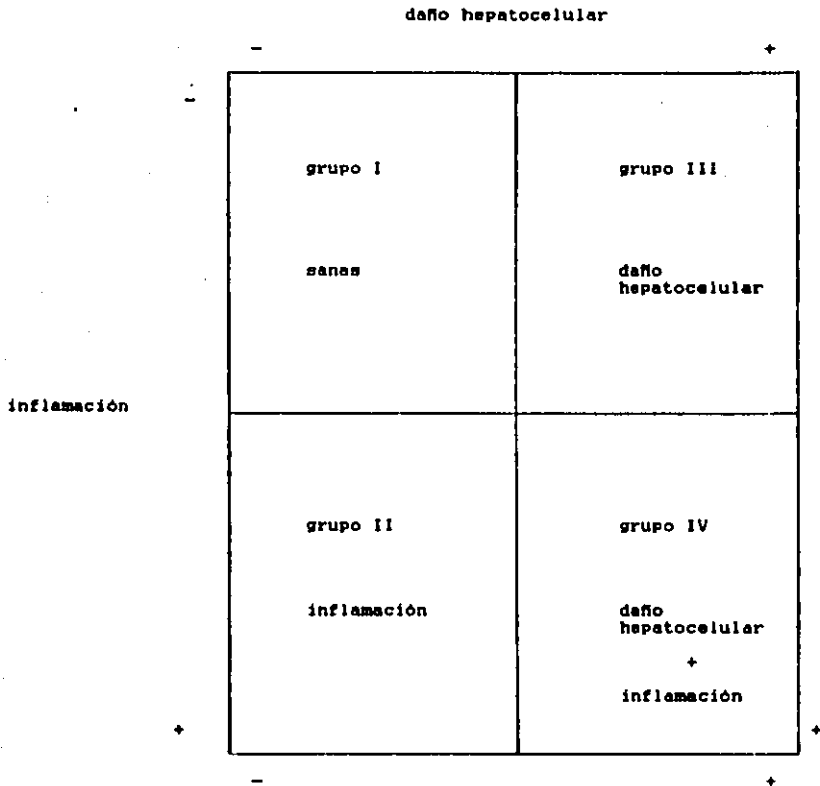
1.1.2. Diseño de comparación simple :

El diseño de comparación simple se utilizó en el caso de los objetivos 1 y 3. En estos casos se tenían dos grupos de comparación independientes con una variable independiente bicondicional.

VARIABLE INDEPENDIENTE :

- 1.- Daño hepatocelular : a.- presente
b.- ausente

DISEÑO GRAFICO FACTORIAL :



Variables dependientes :

- 1.- proliferación de timocitos. (interleucina 1)
- 2.- reducción del nitroazul de tetrazolio. (fagocitosis)

Grupos de estudio :

- 1.- ratas con inflamación sin daño hepatocelular
- 2.- ratas con inflamación con daño hepatocelular.

2.- Descripción de la muestra :

2.1. rata. sexo masculino. adulto, entre 250 y 350 g de peso.

cepa : Fisher. n(total)= 100

2.2. ratón. sexo masculino, 4-6 semanas de edad.

cepa : NIH. n(total)= 100 *

Ambos grupos de animales tuvieron libre acceso a alimento y a agua. El alimento contenía los elementos de una preparación comercial estándar para roedores.

3.- definición de las variables :

3.1. Variables independientes :

* Ambos grupos de animales fueron amablemente proporcionados por los laboratorios de Control de Calidad del I.M.S.S.

3.1.1. Daño hepatocelular .- Se consideró como tal a la evidencia histológica de necrosis y regeneración hepáticas en ratas a las que se había administrado tetracloruro de carbono (CCl₄) por vía intraperitoneal a dosis de 0.1 ml, 2 veces por semana durante 10 semanas (122,124).

3.1.2. Inflamación .- Se produjo por la administración de 20 cc de aceite mineral por vía intraperitoneal, esta elección se tomó considerando la experiencia previa de nuestro laboratorio, en base a la cual se consideró que 72 horas después de la administración de esta sustancia se presentaba con mayor intensidad la respuesta inflamatoria (129,148-149).

3.2. Variables dependientes :

3.2.1. Interleucina 1. Se midió a través de la respuesta obtenida por medio del ensayo del FAL. Este a su vez se cuantificó utilizando el ensayo de proliferación de timocitos. El factor activador de linfocitos es un componente de la interleucina 1 y cuya actividad biológica predominante es la de aumentar la respuesta proliferativa de los timocitos (5).

3.2.2. Zinc sérico.- Elemento metálico divalente. Se midió por medio de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 403 de helio-neón (137).

3.2.3.- Cobre sérico.- Elemento metálico divalente. Se midió por medio de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un

espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 403 de helio-neón (143).

3.2.4.- Fagocitosis .- Se utilizó la prueba de la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NBT) la cuál constituye un medio para evaluar una parte del proceso de fagocitosis. El NBT es un compuesto hidrosoluble que da lugar a formazán, un colorante de color azul intenso que al ser reducido es posible medirlo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 515 nm. Los leucocitos reducen el colorante NBT a azul de formazán por la acción de la actividad enzimática de la NADH oxidasa (146-147).

4.- Descripción de las técnicas de medición :

4.1. Ensayo de proliferación de timocitos : Se obtuvieron asépticamente los timos de ratones NIH de sexo masculino que tuvieran entre 4 y 6 semanas de edad. El ratón se anestesiaba inicialmente con éter y en forma posterior con objeto de conseguir una anestesia más prolongada se les administró fenobarbital por vía intraperitoneal a dosis de 4 mg/10 g de peso. El timo se extrajo mediante su visualización con microscopio de disección, colocándose en solución salina al 0.9 % . En campana de flujo laminar en forma inmediata a la extracción se separaron los timocitos mediante raspado mecánico del timo, se filtraron a través de nylon y se lavaron 2 veces con PBS a pH de 7.4 y a temperatura de 4 C. Se agregó cloruro de amonio al 0.1 % (1 ml) y se dejó 10 minutos a la temperatura ambiente y en reposo, enseguida se lavó 3 veces con PBS y se resuspendieron las células

en RPMI 1640 más suero fetal de carnero al 10 %. Se estandarizaron las células a 1 millón/100 microlitros. El conteo celular se efectuó siempre dos veces y el valor final fué el promedio de ambas mediciones. Para ello se utilizaron siempre pipetas de glóbulos blancos y se contaron las cuatro cuadrículas de la cámara. El cálculo de las células se obtuvo mediante la fórmula : cuenta de las cuatro cuadrículas X 50 X 1.000 = millones de células/ml. Posterior a cada conteo se valoró la viabilidad celular mediante el azul de tripano ; solamente se procesaron las muestras cuya viabilidad celular fuese mayor del 80 % .

Las células obtenidas en esta forma se cultivaron en placas de microtitulación de fondo plano con 96 compartimentos con o sin fitohemaglutinina a una concentración de 1/100 agregándose 50 microlitros de sobrenadante a diferentes diluciones. (concentración final de 25 %) . a temperatura de 37 grados C y en ambiente de CO₂. A las 40 horas los cultivos fueron adicionados con 3H timidina a una concentración de 1 microcurie. Las células fueron cosechadas 8 horas después (23,24).

Cada uno de los ensayos fué efectuado por triplicado y el resultado considerado fué el promedio de los tres. La variabilidad intraensayo fué menor del 13 %. El estándar utilizado fué amablemente proporcionado por el Dr. J. Alcocer Varela. No se realizaron ensayos que permitieran cuantificar la presencia de IL-2. En este sentido, se pensó que el hecho de obtener los macrófagos de la cavidad peritoneal disminuiría la posibilidad de tener linfocitos en el cultivo.

4.1.1. Obtención de los sobrenadantes (interleucina 1) : Se obtuvieron de ratas sanas y de ratas con daño hepático a las cuales se les había provocado un estímulo inflamatorio 72 horas antes mediante la administración de aceite mineral intraperitoneal en una cantidad de 20 cc. Estos parámetros fueron decididos de acuerdo a un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (resultados no publicados) y a un estudio piloto realizado en forma previa al desarrollo de la propia investigación y descrito en el apéndice 1.

Previo anestesia a las ratas con éter se les realizó un lavado peritoneal con PBS a temperatura de 37 C y pH de 7.4 . La cantidad de liquido de lavado en cada caso siempre fué de 50 ml. El liquido obtenido se lavó 3 veces con PBS centrifugándose a mil revoluciones por minuto en cada ocasión. Se agregaron 3 ml de cloruro de amonio al 0.1 % estéril y se dejó 10 minutos en reposo a 37 grados C para lavar nuevamente por 3 veces con PBS a mil revoluciones/minuto. Se resuspendieron las células en RPMI con suero fetal al 10 %, se ajustaron a 1 millón/ml y se verificó que su viabilidad fuese mayor al 80 % mediante la prueba de azul de tripano. En cajas de Petri se colocaron 1 millón de células en 10 ml de medio de cultivo (RPMI + suero fetal al 10 %) y se incubaron a 37 grados C en atmósfera de CO2 durante 2 horas. Se desechó el sobrenadante y se lavó con suavidad en tres ocasiones, desechándose en cada ocasión el sobrenadante. Los macrófagos se obtuvieron por medio de raspado suave del fondo de las cajas de Petri y lavado con solución de Hanks a 4 grados C. A los

macrófagos así obtenidos se les lavó en dos ocasiones y se resuspendieron en RPMI y suero fetal al 2 %. Se ajustaron las células a una cantidad de 1 millón de células/ml y se verificó su viabilidad. Se incubaron en una cantidad fija de 1 millón de células por cada caja de Petri durante 24 horas a 37 grados C., en una atmósfera de CO₂. Al finalizar este lapso se recogió el sobrenadante, se filtró (0.45 milimicras) y se almacenó hasta su uso a - 60 grados C. (16,28).

4.1.2.- Zinc y cobre : A través de seccionar la cola de la rata se obtuvo entre 1 y 1.5 ml de sangre, la cual se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos; se recolectó el suero y se almacenó a - 60 grados C. hasta el momento de realizar el análisis. Se excluyeron las muestras hemolizadas que se podían identificar a simple vista. La medición se efectuó por medio de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 403 de helio-neón (113). En forma previa a las determinaciones se llevó a cabo la estandarización del espectrofotómetro mediante la determinación de valores de zinc y cobre a concentraciones conocidas.

4.1.3.- Fagocitosis : Se obtuvieron macrófagos peritoneales de acuerdo al procedimiento descrito en el ensayo de proliferación de timocitos.

Los macrófagos obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 1,000 RPM. se añadieron 3 ml de NH₄Cl al 0.87 %, se resuspendieron y se centrifugaron a 1,000 RPM , para finalmente lavarse

dos veces con una solución amortiguada de Krebs-Henseleit-bicarbonato a pH de 7.4 y con glucosa al 2 %. Se centrifugó durante 10 minutos a 1,000 RPM en forma posterior a cada uno de los lavados. (la vigencia de los reactivos se adoptó de acuerdo a la aceptada generalmente).

Se añadió entonces 0.5 ml de la solución de KHB-G y se fijó el número de células a una concentración final de 25,000/ml. Se prepararon 3 tubos para cada muestra, uno para evaluar la fagocitosis en reposo, uno para registrar la actividad y un control, con un duplicado para cada uno de ellos. Se agregaron reactivos en la siguiente forma :

- | | |
|-------------------------------------|-----------|
| 1.- Solución de KHB-G | : 0.4 ml |
| 2.- KCN 0.01 M | : 0.1 ml |
| 3.- NBT 0.1 % en sol. salina 0.85 % | : 0.4 ml |
| 4.- Latex (solo para actividad) | : 0.05 ml |

Se preincubó a 37 grados C durante 15 minutos

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| 5.- Suspensión celular ajustada | : 0.1 ml |
| 6.- HCl 0.5 % (solo para el control) | : 10 ml |

Se incubó a 37 grados C durante 15 minutos

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 7.- HCl 0.5 % (reposo y actividad) | : 10 ml |
|------------------------------------|---------|

Se centrifugó a 1,000 RPM durante 15 minutos a 4 grados C posterior a lo cual se decantaron los tubos. Se extrajo del sedimento azul el NBT reducido con 4 ml de piridina y colocando los tubos a ebullición durante 10 minutos en campana de extracción. Se dejó enfriar y se centrifugó durante 15 minutos a 1,000 RPM para leer finalmente la densidad óptica en espectrofotómetro a 515

nm. El espectrofotómetro se calibró mediante el uso de un control de reactivos antes de cada medición problema.

Los resultados se reportan en tres formas :

a: densidad óptica obtenida.

b: índice kappa : el cual se obtiene por la siguiente fórmula :
densidad óptica de actividad / densidad óptica de reposo

c: índice delta : se obtuvo de la siguiente forma :
densidad óptica de actividad - densidad óptica de reposo.

Los valores de referencia para los neutrófilos humanos son :

kappa = 2.8 a 3.6

delta = 0.233 +/- 0.104

El ajuste de células se realizó mediante una dilución 1:20 con una pipeta de Thoma y utilizando como diluyente el azul de tripano. Se contó en la cuadrícula de glóbulos rojos 5 cuadros y se multiplicó por una constante de mil el valor obtenido. El resultado considerado fué el promedio obtenido de las dos cámaras.

4.2.- Descripción de las variables independientes :

4.2.1.- Daño hepatocelular : Se produjo mediante la administración de CCl₄ en ratas, de sexo masculino, con un peso entre 200 y 250 g y una edad entre 8 y 10 semanas a la fecha de la primera administración del hepatotóxico.

El CCl₄ se agregó a una cantidad igual de aceite mineral y se administró a una dosis de 0.2 ml, por vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 10 semanas. La evaluación de la cirrosis

en las ratas se realizó mediante el examen macroscópico del hígado y mediante examen microscópico de cortes del mismo, en los cuales se debía encontrar evidencia de cicatrización difusa y nódulos de regeneración celular. El aspecto macroscópico del hígado de estas ratas usualmente presentó un aspecto granular e irregular generalizado, con una consistencia aumentada y una coloración blanco-grisacea. El hígado de las ratas sanas no presentó evidencia de alteraciones histológicas o macroscópicas.

4.2.2.- Inflamación : Se produjo a través de la administración de 20 cc de aceite mineral por vía intraperitoneal. La toma de productos para la medición de las variables dependientes se realizó 72 horas después de la administración del aceite.

4.3.- Nivel de medición de las variables :

I. Variables independientes :

1.- Daño hepático : nominal (presente o ausente)

2.- Inflamación : nominal (presente o ausente)

II. Variables dependientes :

1.- Interleucina 1 : intervalo (cuentas por minuto)

2.- Zinc : intervalo (microgramos/100 ml)

3.- Cobre : intervalo (microgramos/100 ml)

4.- Fagocitosis : intervalo (densidad óptica)

5.- Análisis estadístico :

Para la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de comparación entre dos promedios, tomando en consideración que el nivel de medición de la variable fuese de intervalo y que las varianzas fuesen homogéneas (prueba de la Fmax).

Cuando las varianzas fueron heterogéneas se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Para el diseño factorial se empleó el análisis de varianza paramétrico de dos vías. cuando hubo significancia se utilizó, para las comparaciones múltiples de medias, la dócima de recorridos múltiples de Student-Neumann-Kuels.

Para determinar la asociación entre dos variables se empleó el coeficiente de correlación de Pearson y para estimar la intensidad de la asociación el coeficiente de determinación.

El nivel de significación que se estableció en todos los casos fué de alfa = 0.05 (bimarginal)

La estimación calculada a través de intervalos de confianza fué en el nivel de 95 % en todos los casos.

Consideraciones sobre el tamaño de la muestra :

En forma previa a la realización del estudio no se contaba con parámetros poblacionales que permitieran servir de base al cálculo del tamaño de la muestra.

Se decidió fijar un número de 6 ratas por grupo considerando como punto central la factibilidad de la investigación, ya que ese era el número esperado de elementos que se podrían analizar durante el periodo de tiempo disponible para realizar el estudio. Finalmente, el número mínimo de sujetos por grupo fué de 5 y el número máximo de 7.

En forma posterior a la terminación de la investigación , considerando al ensayo de proliferación de timocitos como base y utilizando los datos obtenidos durante el estudio, podemos determinar el grado de la diferencia que hubiera sido necesario alcanzar para obtener una diferencia estadísticamente significativa a los siguientes niveles :

alfa = 0.05

beta = 0.20

n = 5

n = 2802 (La mayor variabilidad observada intraensayo, obtenida a partir de los promedios de cada dilución y expresado como cuentas por minuto).

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 2(\sigma)^2}{(x_1 - x_2)^2}$$

delta = 4961

La diferencia necesaria para obtener una diferencia estadísticamente significativa a los parámetros fijados es de 4961 cuentas por minuto.

La diferencia obtenida en el estudio fué de 2774 cuentas por minuto.

VIII. RESULTADOS

1.- Curvas de proliferación de timocitos :

Los timocitos tratados con los sobrenadantes de los macrófagos de las ratas con daño hepático mostraron una tendencia menor a proliferar que aquellos timocitos tratados con sobrenadantes de macrófagos de ratas sanas. (tabla 1) (gráfica 1). Esta diferencia no tuvo significación estadística. (tabla 2)

En el grupo de ratas sanas, cuando se trató a los timocitos con sobrenadantes de células estimuladas con LPS se observó una proliferación mayor que la que se derivó de los sobrenadantes de células no estimuladas con LPS. (gráfica 2a) Esta diferencia se presentó también en el grupo de ratas con daño hepático, aún cuando la diferencia observada fué menor. (gráfica 2b) En las gráficas 2c y 2d se hace evidente una diferencia entre los grupos de ratas sanas y las que tenían daño hepático, ya sea que hubieran sido estimuladas o no con LPS. sin embargo, como ya se mencionó, esta diferencia no fué estadísticamente significativa.

Cuando los datos se agrupan en forma de valores promedio para cada una de las distribuciones de cada uno de los grupos, tanto cuando se realizó estimulación de las células con LPS, como cuando no se llevó a efecto, se mantiene la tendencia en la diferencia entre ratas sanas y ratas con daño hepático. (gráficas 3a y 3b). Las respuestas de estimulación de proliferación celular en los diferentes grupos de ratas fué muy homogénea. (gráfica 4) De tal forma que cuando se comparan las distribuciones de los diversos

elementos dentro de cada uno de los grupos no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. (tablas 3 y 4)

2.- Zinc : Al comparar los niveles de zinc sérico en los diferentes grupos de ratas se hizo evidente una diferencia. (gráfica 5)(tabla 5) Las ratas sanas sin inflamación disminuyeron sus niveles de zinc cuando fueron sometidas a un estímulo inflamatorio. Esta diferencia fué estadísticamente significativa. En cambio, las ratas con daño hepático cuando fueron sometidas a un proceso inflamatorio, aún cuando tendieron a disminuir sus niveles, ésta diferencia no tuvo significación estadística. (gráfica 5)(tabla 6).

Los niveles séricos de zinc fueron diferentes en los grupos basales de ratas, es decir, el grupo de ratas sanas sin inflamación tuvo niveles significativamente más bajos en su determinación inicial con respecto al grupo de ratas con daño hepático y sin inflamación. Los grupos que tenían actividad inflamatoria, en cambio, no mostraron niveles diferentes a un nivel de significancia estadístico. (gráfica 5)(tabla 6).

3.- Cobre : Al comparar los niveles de cobre sérico en los diferentes grupos de ratas se mostró una diferencia. (gráfica 6)(tabla 7) Los niveles de cobre sérico variaron significativamente en el grupo de ratas sanas, ya que cuando se aplicó un estímulo inflamatorio, dichos niveles aumentaron considerablemente. En el grupo de ratas con daño hepático, al aplicar el estímulo inflamatorio la diferencia obtenida entre el

grupo con inflamación y el grupo sin la misma no tuvo significación estadística. Al comparar los grupos de ratas que no sufrieron inflamación fué evidente una diferencia al nivel de significancia estadística prefijado. Sin embargo, entre los grupos de ratas en las que se aplicó un estímulo inflamatorio no se observó una diferencia de esa magnitud. (gráfica 6)

La gráfica 7 permite apreciar la existencia de una relación entre los niveles séricos de zinc y los de cobre en los diferentes grupos de estudio. Es decir, En los grupos de ratas sin inflamación los niveles séricos de zinc fueron los más altos. En cambio, cuando se administró un estímulo inflamatorio estos niveles tendieron a disminuir, ocurriendo este fenómeno en menor grado en las ratas sanas en comparación a las ratas con daño hepático. Lo opuesto ocurrió en el caso del cobre, así, en los grupos sin inflamación los niveles séricos de este catión fueron los más bajos y al aplicar un estímulo inflamatorio, dichos niveles tendieron a aumentar. Al correlacionar los niveles de ambos cationes en cada uno de los grupos de ratas fué posible observar que a diferencia de las ratas con daño hepático se presentó una marcada correlación positiva en los grupos de ratas sanas con y sin inflamación. (gráficas 8 y 9). La relación entre zinc y cobre fué muy estrecha en el grupo de ratas sanas sin inflamación donde el coeficiente de correlación fué de 0.92, con un coeficiente de determinación de 0.84 y una $p < 0.01$ (gráfica 10a) (tabla 8) Este mismo tipo de relación se mantuvo en el grupo de ratas sanas con inflamación en el cuál el coeficiente de

correlación fué de 0.85, con un coeficiente de determinación de 0.72 y una $p < 0.05$ (gráfica 10b)(tabla 8). En los grupos de ratas con daño hepático la correlación se invirtió y se tornó negativa. En el grupo que no fué sometido a un estímulo inflamatorio el valor de correlación fué de - 0.43 con un coeficiente de determinación de tan sólo 0.18 y sin que la probabilidad encontrada fuese estadísticamente significativa. (gráfica 10c)(tabla 8). En el grupo de ratas con daño hepático y que fueron expuestas a un estímulo inflamatorio la correlación tendió a aumentar siempre en un sentido negativo, con un coeficiente de determinación de 0.46, sin que éste tuviese significación estadística. (gráfica 10d)(tabla 8).

4.- Fagocitosis : Al comparar los resultados obtenidos a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los diversos grupos entre sí se hizo manifiesta una diferencia. (gráfica 11)(tabla 9). En el grupo de ratas sanas se presentó una clara diferencia en el grado de reducción del nitroazul de tetrazolio entre las células en reposo y aquellas que se encontraban en actividad. Esta diferencia fué estadísticamente significativa (tabla 10). En el grupo de ratas con daño hepático, una diferencia similar se hizo ostensible (tabla 10). Sin embargo, al comparar la reducción del colorante en ambos grupos cuando las células se encontraban en reposo, no se encontraron diferencias con significado estadístico. (gráfica 11) (tabla 10). Este mismo hecho ocurrió cuando se compararon las células estimuladas en ambos

grupos. (gráfica 11) (tabla 10).

Indice kappa : No se identificó una diferencia estadísticamente significativa en relación a este índice entre los dos grupos de ratas. (tabla 11). Fué evidente, sin embargo, una mayor variabilidad en el comportamiento de los macrófagos en el grupo de ratas con daño hepático, obteniéndose en este grupo, tanto los valores más altos como los más bajos (gráfica 12). Una situación similar ocurrió en el caso del índice delta, donde al igual que en el caso anterior no se obtuvo significancia estadística, aún cuando la tendencia observada en el comportamiento de las células fué similar al anterior (gráfica 13)(tabla 12).

Al comparar el promedio en ambos grupos, así como su mediana se observa que fueron mayores en el grupo de ratas con daño hepático en lo que al índice kappa se refiere. (gráfica 12). Al analizar el índice delta fué notoria una mayor variabilidad, por lo que el promedio de las ratas con daño hepático fué menor que en el grupo de ratas sanas, sin embargo, ocurrió lo opuesto al considerar la mediana, medida con la cual se observó un valor más alto en el grupo de ratas con daño hepático. (gráfica 13).

Identificación de los grupos de estudio :

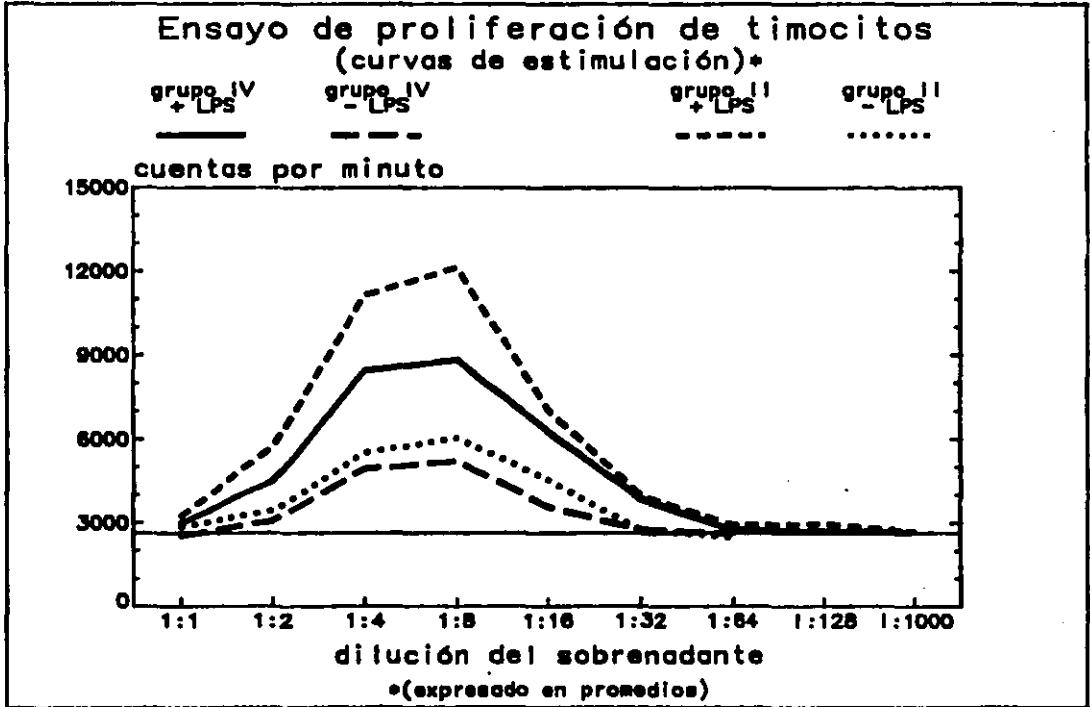
-
- GRUPO I : ratas sanas sin inflamación.**
- GRUPO II : ratas sanas CON inflamación**
- GRUPO III : ratas con daño hepático sin inflamación.**
- GRUPO IV : ratas con daño hepático CON inflamación.**
-

TABLA 1.
 Proliferación de timocitos en los grupos de ratas sanas y con daño hepático de acuerdo a la concentración de IL-1 y a la presencia o no de LPS.

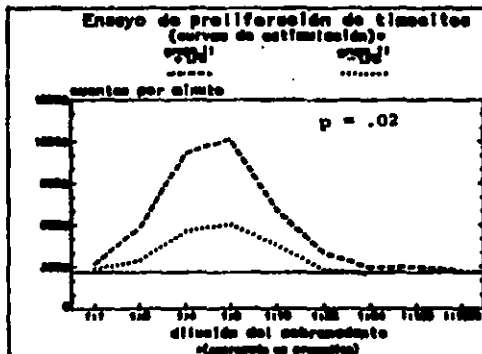
dilución del sobrenadante		sanas		daño hepático	
		LPS +	LPS -	LPS +	LPS -
1:1	x	3217	2847	2965	2522
	s	580	356	213	571
1:2	x	5714	3425	4501	3066
	s	1024	716	954	663
1:4	x	11132	5522	8441	4954
	s	2182	746	788	340
1:8	x	12135	6038	9474	5223
	s	2802	1017	1928	899
1:16	x	7062	4543	6273	3580
	s	1410	339	707	388
1:32	x	3971	2739	3856	2744
	s	1207	488	864	185
1:64	x	2929	2483	2741	2620
	s	467	277	355	327
1:128	x	2957		2686	
	s	482		197	
1:1000	x	2659		2655	
	s	215		285	
medio + células	x	2790			
	s	422			
medio	x	2644			
	s	209			

x = promedio

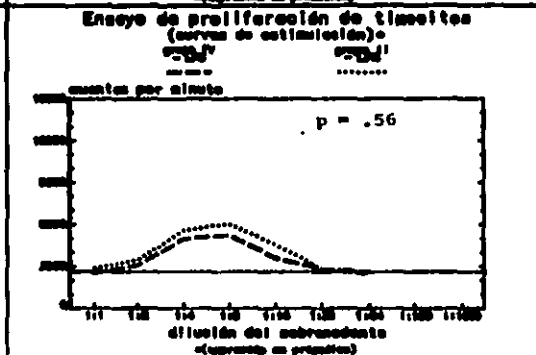
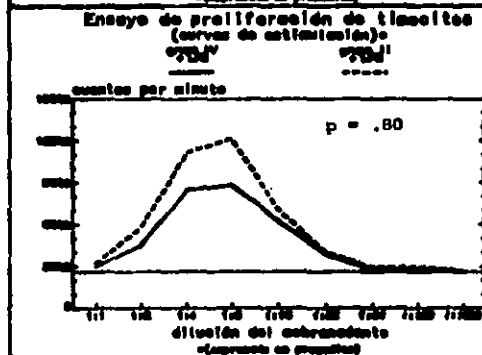
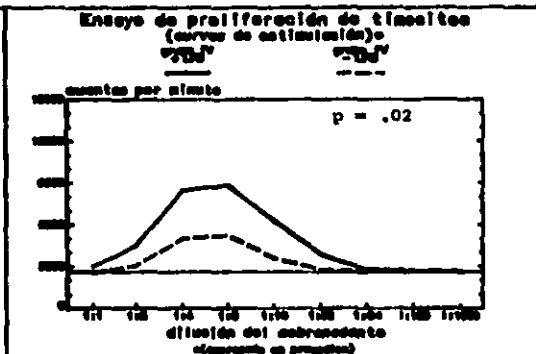
s = 1 desviación estándar



gráfica 2a

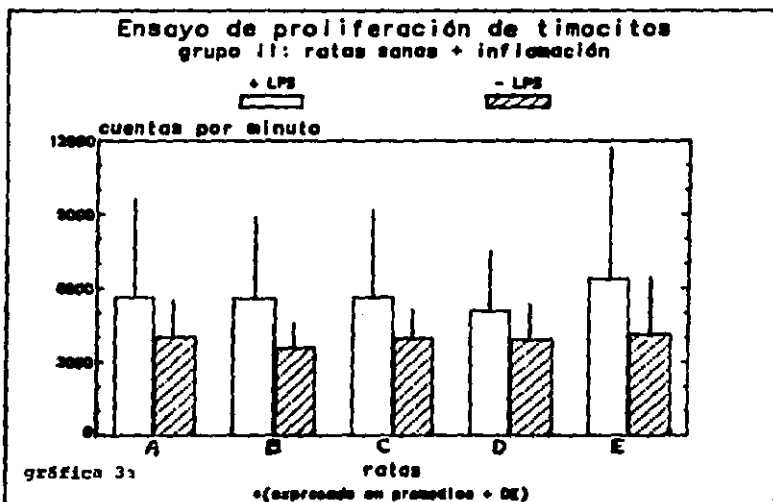


gráfica 2b

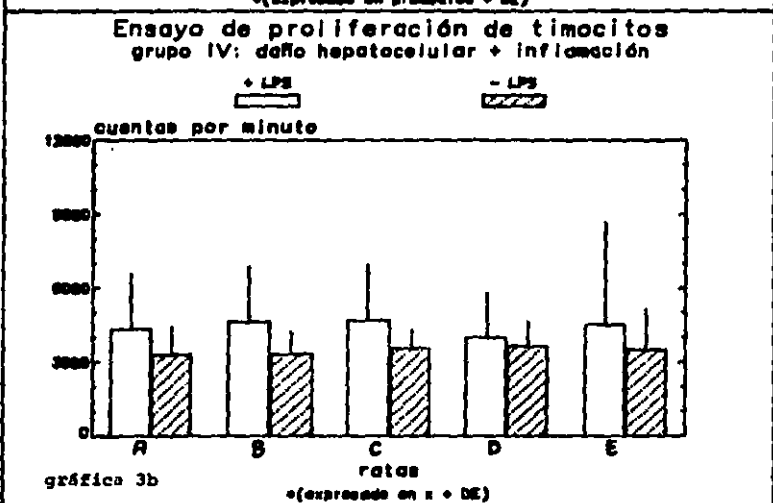


gráfica 2c

gráfica 2d



gráfica 3a



gráfica 3b

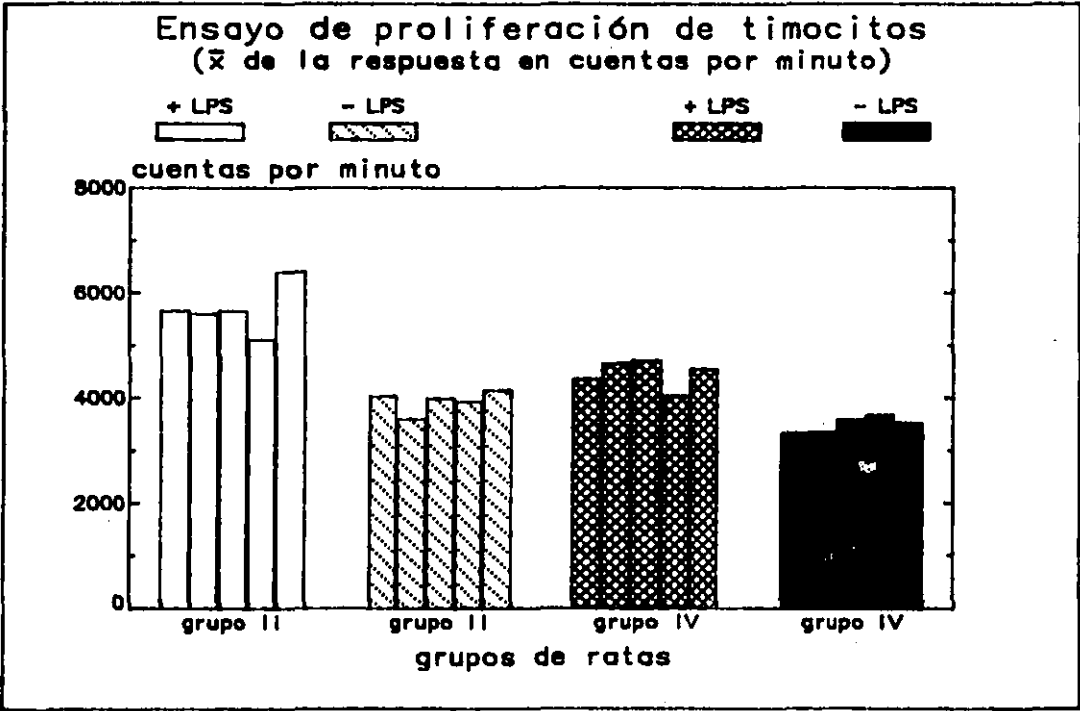


TABLA 3.

Análisis de varianza de una vía para las curvas de proliferación de timocitos en el grupo de ratas sanas con inflamación.

Grupo II. ratas sanas con inflamación.
(células estimuladas con LPS)

	A	B	ratas C	D	E
x	5665	5611	5662	5112	6409
s	3975	3401	3551	2382	5364
	g1N = 4		g1D = 40		F = 0.137
			p = 0.96		

grupo II. ratas sanas con inflamación.
(células sin estimulación con LPS)

	A	B	ratas C	D	E
x	4035	3600	3993	3933	4151
s	1587	1069	1380	1264	2156
	g1N = 4		g1D = 30		F = 0.127
			p = 0.97		

TABLA 4.

Análisis de varianza de una vía para las curvas de proliferación de timocitos en el grupo de ratas con daño hepático e inflamación.

grupo IV : ratas con daño hepático con inflamación.
(células estimuladas con LPS)

	A	B	ratas C	D	E
x	4356	4651	4704	4030	4544
s	2248	2519	2708	2003	3299
	gIN = 4		gID = 50		F = 0.122
			p = 0.97		

grupo IV : ratas con daño hepático con inflamación.
(células sin estimulación con LPS)

	A	B	ratas C	D	E
x	3328	3339	3585	3669	3535
s	1183	929	940	1219	1681
	gIN = 4		gID = 32		F = 0.117
			p = 0.97		

TABLA 5.
Distribución de los valores de zinc y cobre séricos
en los grupos de ratas.

ZINC

grupo I	grupo II	grupo III	grupo IV
188	113	143	93
220	116	147	114
228	140	153	126
241	152	154	138
273	155	155	141
310	172	161	177
440	212	213	210

CORRE

grupo I	grupo II	grupo III	grupo IV
105	168	248	232
136	168	228	217
122	169	185	144
128	194	118	225
132	172	149	200
133	180	182	165
172	249	150	146

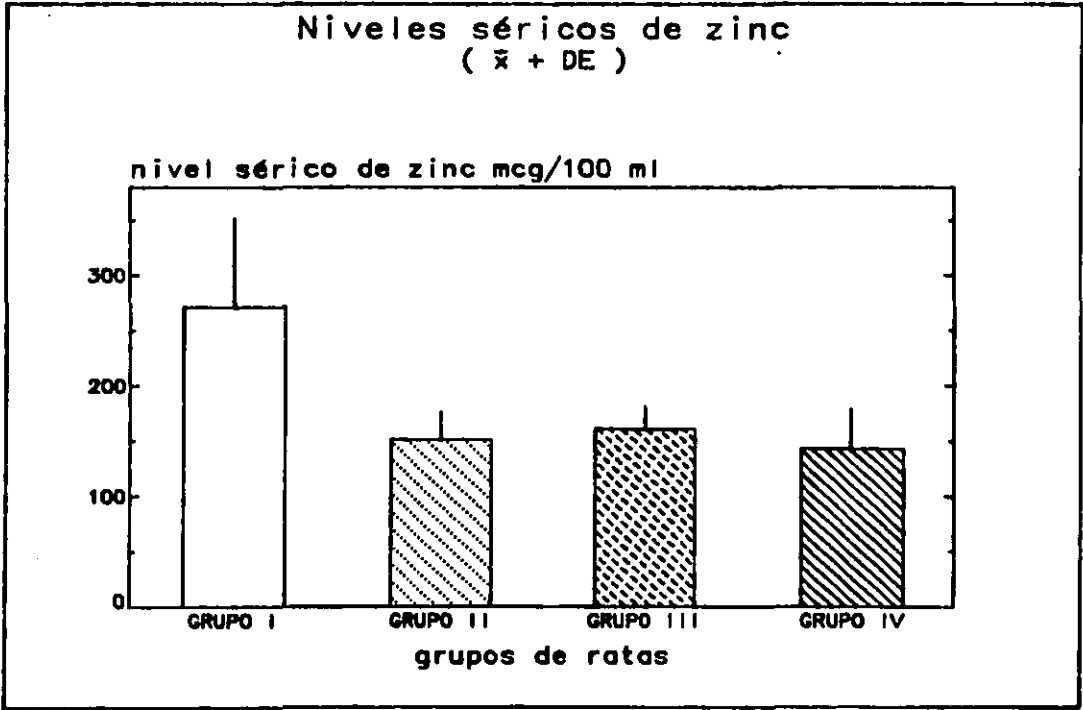


TABLA 6.

Análisis de varianza de dos vías para los niveles séricos de zinc en las ratas sanas y con daño hepático de acuerdo a si recibieron o no un estímulo inflamatorio.

	GRUPOS DE RATAS			
	grupo I	grupo II	grupo III	grupo IV
n	7	7	7	7
x	271	151	160	142
s	83	34	23	39
condiciones :			razón F	P
sanas-daño hepático			9.64	.005
no inflamación-inflamación			12.93	.001
interacción			7.03	.01

Comparaciones múltiples :

Pruebas de Student - Neuman - Kuels :

grupo I	vs	grupo II	S
grupo I	vs	grupo III	S
grupo I	vs	grupo IV	S
grupo II	vs	grupo III	NS
grupo II	vs	grupo IV	NS
grupo III	vs	grupo IV	NS

S = estadísticamente significativa
 NS = no estadísticamente significativa

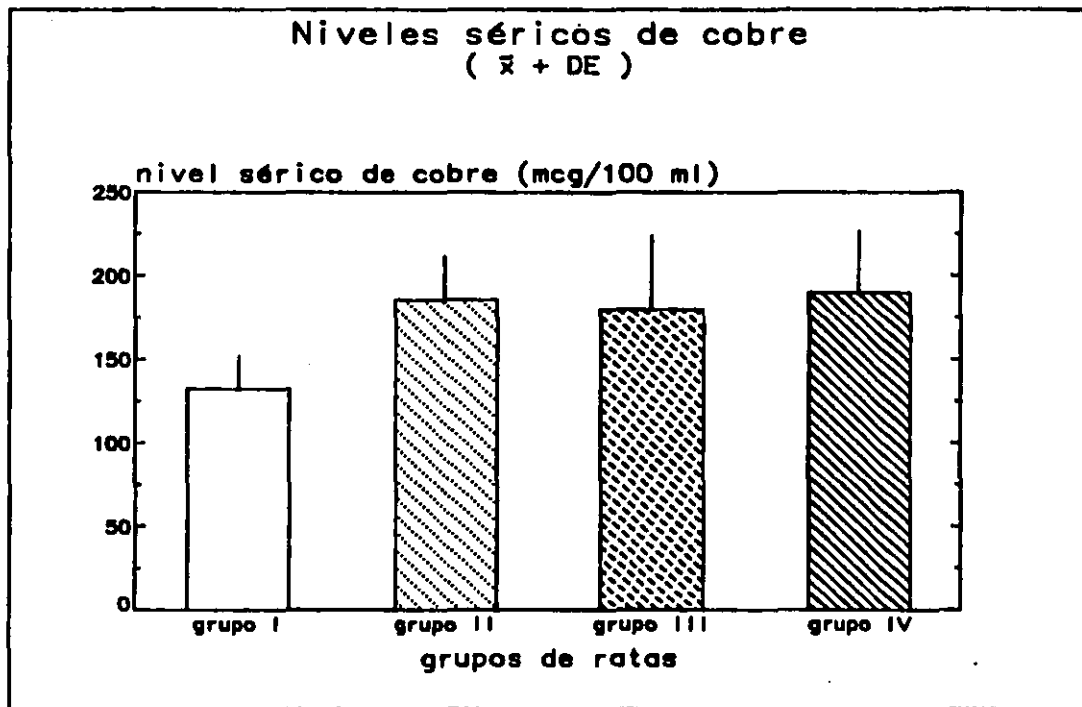
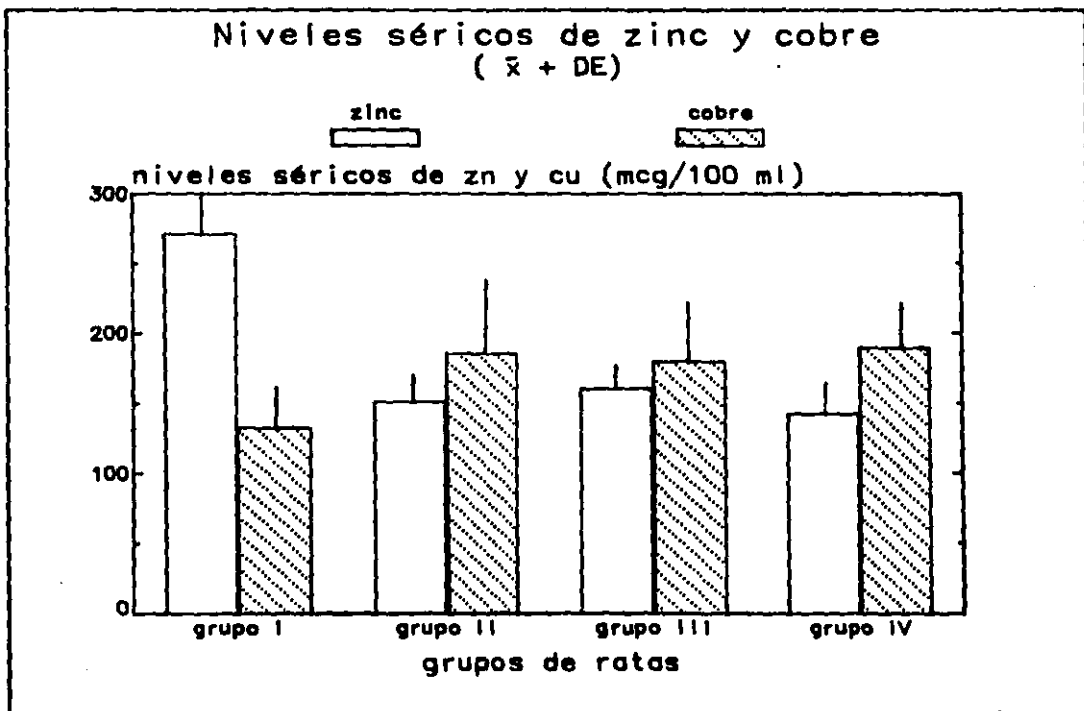


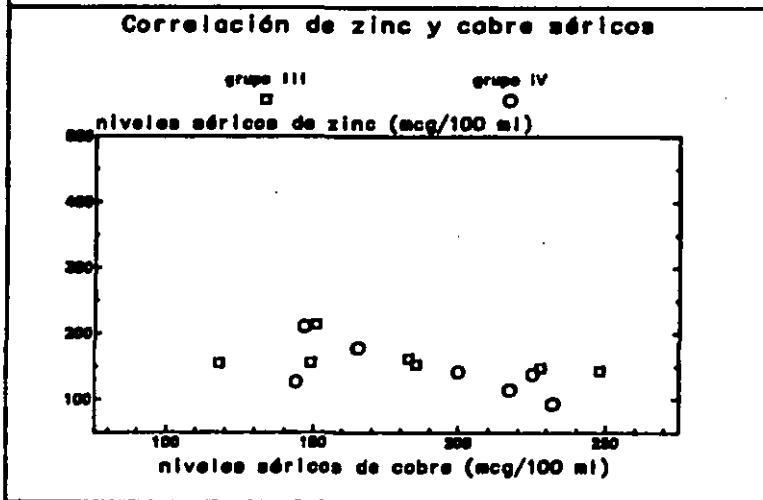
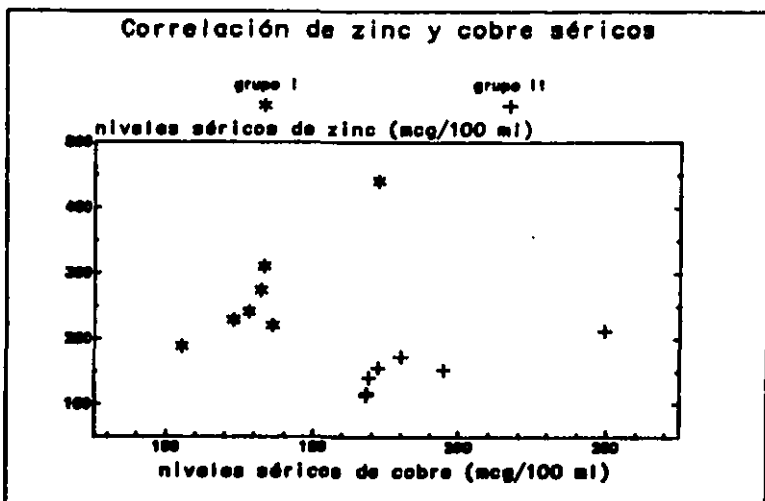
TABLA 7.

Análisis de varianza de dos vías para los niveles séricos de cobre en los grupos de ratas sanas y con daño hepático y de acuerdo a si recibieron o no un estímulo inflamatorio.

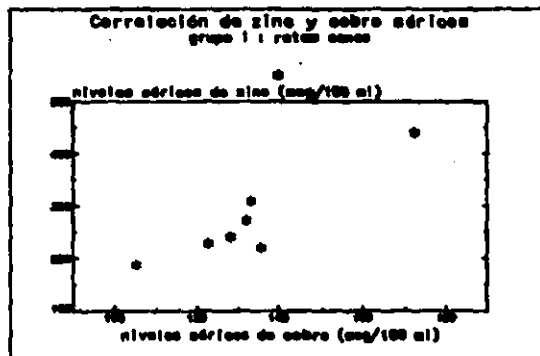
GRUPOS DE RATAS				
	grupo I	grupo II	grupo III	grupo IV
n	7	7	7	7
x	132	185	180	189
s	20	29	45	37
<hr/>				
Condiciones :			razón F	p
sana - daño hepático			3.87	.06
no inflamación - inflamación			5.78	.02
interacción			2.73	.11
<hr/>				
Comparaciones múltiples :				
Pruebas de Student - Neuman - Kuels :				
grupo I	vs	grupo II		S
grupo I	vs	grupo III		S
grupo I	vs	grupo IV		S
grupo II	vs	grupo III		NS
grupo II	vs	grupo IV		NS
grupo III	vs	Grupo IV		NS

S = estadísticamente significativo
 NS = no estadísticamente significativo.

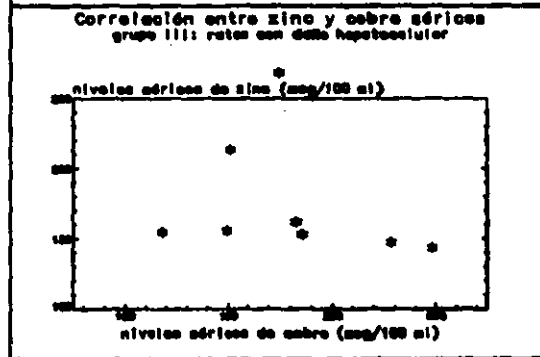
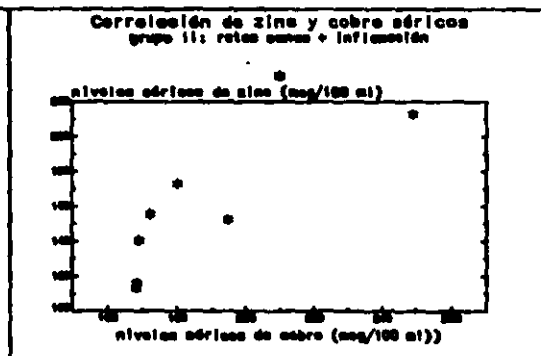




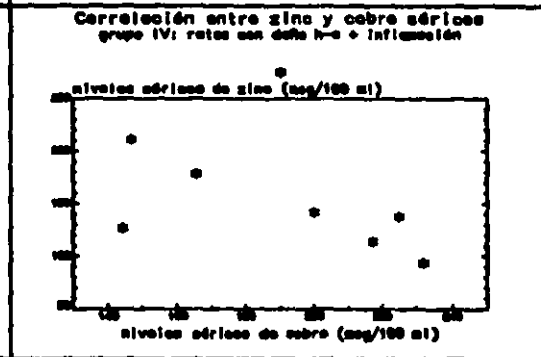
gráfica 10a



gráfica 10b



gráfica 10c



gráfica 10d

TABLA 8.

Correlación entre los niveles séricos de zinc y cobre en los grupos de ratas sanas y con daño hepático de acuerdo a si fueron sometidas o no a un estímulo inflamatorio.

GRUPOS DE RATAS

	grupo I	grupo II	grupo III	grupo IV
n	7	7	7	7
r	.92	.85	-.43	-.68
r ²	.84	.72	.18	.46
t	5.23	3.75	1.09	2.10
gl	5	5	5	5
p	.003	.01	.32	.08

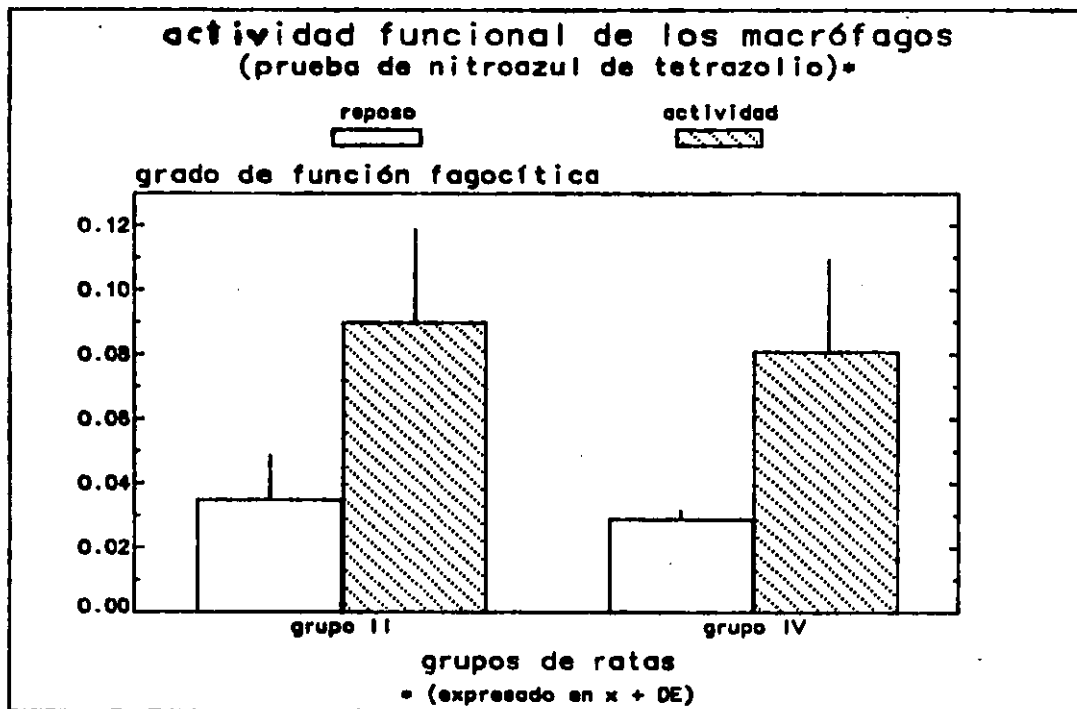


TABLA 9.

Distribución en unidades de densidad óptica obtenidos a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los grupos de ratas sanas y con daño hepático que habían sido sometidas a un estímulo inflamatorio.

GRUPO II.

macrófagos peritoneales	
reposo	actividad
0.045	0.120
0.030	0.090
0.060	0.150
0.030	0.060
0.030	0.080
0.020	0.080
0.030	0.050

GRUPO IV.

macrófagos peritoneales	
reposo	actividad
0.030	0.070
0.030	0.100
0.025	0.040
0.030	0.120
0.040	0.070
0.020	0.090

TABLA 10.

Análisis de varianza de una vía de las unidades de densidad óptica obtenidos a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los grupos de ratas sanas y con daño hepático de acuerdo a si los macrófagos peritoneales se encontraban en reposo o en actividad.

MACROFAGOS PERITONEALES				
	RATAS SANAS		RATAS CON DAÑO HEPATICO	
	reposo	actividad	reposo	actividad
n	7	7	6	6
x	0.035	0.090	0.029	0.081
s	0.013	0.034	0.006	0.027
mediana	0.030	0.080	0.030	0.080
	g1N = 3		g1D = 22	
	F = 11.38			
	p = 0.0001			
Comparaciones múltiples :				
Pruebas de Student - Newman - Kuels.				
grupo II reposo	vs	grupo II actividad		S
grupo II reposo	vs	grupo IV reposo		NS
grupo II actividad	vs	grupo IV actividad		NS
grupo IV reposo	vs	grupo IV actividad		S
S = estadísticamente significativo				
NS = no estadísticamente significativo.				

TABLA 11.

Indice Kappa obtenido a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los grupos de ratas sanas y con daño hepático y que fueron sometidas a un estímulo inflamatorio.

SANAS	DAÑO HEPATICO
2.66	2.33
3.00	3.33
2.50	1.60
2.00	4.00
2.60	1.75
2.50	4.50
2.66	

Prueba de comparación de diferencias entre promedios para dos muestras independientes :

	sanas	daño hepático
n	7	6
x	2.56	2.91
s	0.29	1.20

$$t = 0.76 \quad gl = 11 \quad p = 0.46$$

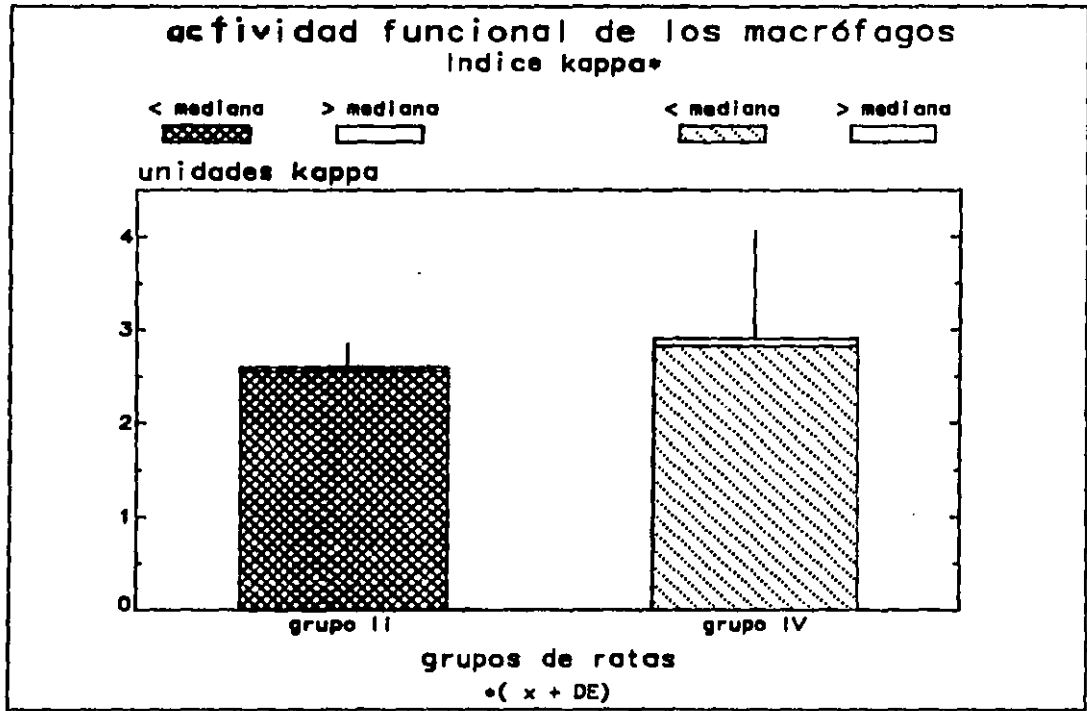
(varianzas heterogéneas : $F = 16.3$ $p = 0.001$)

$$IC\ 95\ \% = .3583 \pm .4692$$

Prueba de suma de rangos de Wilcoxon :

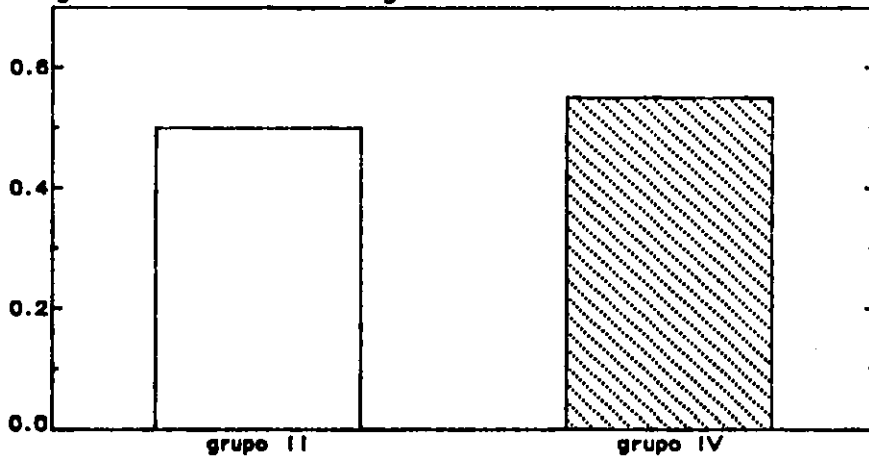
mediana	2.60	2.83
suma de rangos	48	43

$$p > 0.05$$



actividad funcional de los macrófagos
Índice delta*

grado de función fagocítica



grupos de ratas
*** (expresado en medianas)**

TABLA 12.

Indice delta obtenido a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los grupos de ratas sanas y con daño hepático y que fueron sometidas a un estímulo inflamatorio.

SANAS	DAÑO HEPATICO
0.075	0.040
0.060	0.070
0.090	0.015
0.030	0.090
0.050	0.030
0.030	0.070
0.050	

Prueba de comparación de diferencias entre promedios para dos muestras independientes :

	sanas	daño hepático
n	7	6
x	0.055	0.052
s	0.022	0.028
t = 0.17	gl = 11	p = 0.86
IC 95 % =	.0025 +/- .014	

IX. DISCUSION.

La IL-1 es considerada la molécula reguladora de la RFA, y el Factor Activador de Linfocitos constituye la prueba más específica con la que se cuenta para su medición. En este estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas sanas y las ratas con daño hepático y que habían sido sometidas a un estímulo inflamatorio en relación con dicho factor. De esta forma los macrófagos peritoneales de ambos tipos de ratas estimularon la proliferación de los timocitos de ratón, sobre todo cuando los macrófagos habían sido estimulados con lipopolisacárido. Podemos considerar que la estimulación con este agente, en realidad correspondió a un segundo estímulo, ya que la administración de aceite mineral a la rata, constituyó, un primer estímulo agresor. Esta puede ser la razón por la cual, los macrófagos no estimulados con lipopolisacárido también respondieran estimulando la proliferación de los timocitos, si bien, esto ocurrió con menor intensidad.

A pesar de no haberse observado una diferencia con significado estadístico, es posible advertir una tendencia en favor de una respuesta más intensa por parte de los macrófagos de las ratas sanas. Pueden proponerse varias explicaciones al respecto : a.- Los macrófagos de las ratas con daño hepático producen una menor cantidad del Factor Activador de Linfocitos; b.- Los macrófagos de las ratas con daño hepático producen una cantidad similar del Factor Activador de Linfocitos, pero su estructura o función se

encuentran alteradas, o bien c.- El sobrenadante de los macrófagos de las ratas con daño hepático contiene factores inhibitorios.

Si la disminución del Factor Activador de Linfocitos a los niveles observados durante el ensayo, ocasionan alguna alteración en la Respuesta de Fase Aguda, es algo que queda por responder y que no puede desprenderse de los resultados de este estudio. Debe recordarse que la IL-1 está constituida por un conjunto de moléculas integradas o bien relacionadas entre sí, por lo que el comportamiento del Factor Activador de Linfocitos no excluye normalidad o anormalidad en el resto de sus componentes.

Como se observa en la gráfica 4, las curvas de proliferación de timocitos fueron muy similares en el grupo de ratas con daño hepático a los resultados obtenidos en el grupo de ratas sanas que no habían sido estimuladas con LPS. Esto podría sugerir que los macrófagos de las ratas con daño hepático y que fueron subsecuentemente estimuladas con LPS responden limitadamente en lo que se refiere a la producción del Factor Activador de Linfocitos.

La IL-1 es producida por una gran variedad de células, si bien la fuente más importante para su producción la constituyen los monocitos. Existe controversia en la literatura médica acerca de si los monocitos en la cirrosis hepática tienen una función alterada. Se han presentado evidencias de que tanto la quimiotaxis como la fagocitosis y la capacidad de dar muerte intracelularmente por parte del monocito se encuentran disminuidas (125).

Los esfuerzos para medir la integridad funcional de los monocitos, en relación con su producción de factores solubles en

cirrosis hepática han sido esporádicos. Así, en pacientes con enfermedad hepática crónica y que no cursaban con un proceso inflamatorio agregado, la producción de IL-1 se encontró aumentada (126). La misma situación se observó en pacientes con hepatitis alcohólica en los que se realizó el ensayo del Factor Activador de Linfocitos (127). Es evidente una discrepancia entre estos resultados y los obtenidos en este estudio, y ello puede explicarse debido a que estos estudios no son comparables entre sí debido principalmente a las siguientes razones: a.- La hepatitis alcohólica es un estado en el cual se presenta una Respuesta de Fase Aguda intensa y claramente identificable. Resulta explicable con manifestaciones así, suponer que la proteína reguladora de esta Respuesta se encuentra aumentada; b.- En la cirrosis hepática establecida, situación en la que se basó el modelo animal utilizado en el presente estudio, no se estudió a los sujetos en condiciones de inflamación agregada y finalmente, c.- Los dos estudios mencionados como antecedente fueron de índole clínica, es decir se basaron en sujetos humanos en donde no es posible la manipulación de las condiciones de inflamación, lo que hizo necesaria la exploración del problema en un modelo animal en el presente estudio. En resumen, No tenemos estudios que puedan servirnos de comparación para nuestros resultados en lo que se refiere a los niveles de respuesta del Factor Activador de Linfocitos.

Un rasgo constante de la Respuesta de Fase Aguda son los

cambios que ocurren en algunos de los cationes divalentes. Estos suelen relacionarse a una respuesta defensiva por parte del huésped, sobre todo ante una agresión de tipo infeccioso. Esta suposición descansa en el hecho de que el zinc y el hierro han demostrado ser elementos indispensables para el crecimiento bacteriano. Congruente con este hecho, en la Respuesta de Fase aguda, los niveles de zinc y de hierro séricos disminuyen.

En los seres humanos jóvenes, el zinc es importante para el crecimiento y para el desarrollo gonadal. Además el zinc es fundamental para el metabolismo de los ácidos nucleicos dada su participación en la DNA polimerasa, si bien la timidina-cinasa es la enzima más sensible a la deficiencia de zinc (130-132).

En el paciente con cirrosis hepática es manifiesta la deficiencia de zinc, la cuál se debe fundamentalmente a las pérdidas urinarias, aún cuando una absorción intestinal disminuida parece contribuir también a este efecto (133-135). Se ha demostrado que tanto la deficiencia como el exceso de zinc altera la respuesta inmune (136-137). En la enfermedad hepática crónica humana, la severidad e la enfermedad parece correlacionar con el grado de alteración en el metabolismo del zinc (138). Asimismo, ha sido posible observar en el ratón deficiente en zinc una clara alteración en la hipersensibilidad de tipo tardío (139). La disminución en los niveles de zinc no parecen restringirse al suero, se ha sugerido que los tejidos con células nucleadas podrían ser también deficientes en el catión (140). Además, se ha propuesto que el zinc podría prevenir la acumulación de colágena

en la rata con daño hepático secundario a la administración de CCl₄ (141). En este estudio fué patente una disminución en los niveles séricos de zinc en las ratas con daño hepático en relación a las ratas control cuando ambos grupos se encontraban en condiciones basales, es decir, sin haberse sometido a un estímulo inflamatorio. En las ratas sanas en las que había actividad inflamatoria, los niveles séricos de zinc disminuyeron en una forma estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando las ratas con daño hepático sin inflamación se compararon con aquellas que habían sido sometidas a un estímulo inflamatorio, la disminución observada fué mínima. Nuevamente, los valores de los grupos de ratas con daño hepático fueron muy similares a los que mostraban las ratas sanas pero con inflamación.

La mínima diferencia observada en los niveles de zinc en el grupo de ratas con daño hepático sin inflamación cuando se comparan con los niveles de zinc de las ratas con daño hepático con inflamación podría interpretarse como una alteración en la Respuesta de Fase aguda, sin embargo, podría también traducir un mecanismo compensatorio basado en que una disminución mayor en los niveles de zinc, a partir de un nivel ya de por sí deficiente, podría resultar intolerable para la supervivencia.

Esta mínima disminución en el grupo de ratas con daño hepático e inflamación podría explicarse en tres formas : a.- No se produjo Mediador Endógeno Leucocitario; b.- Se produjo, pero estructural o funcionalmente anormal, de tal forma, que eso explica la falta de respuesta y c.- Se produjo en forma normal el mediador debido a

que la rata con daño hepático tiene también un proceso inflamatorio capaz de generar la producción de la molécula, ya sea este secundario al daño hepático inherente o en el caso particular del modelo experimental utilizado a que las punciones peritoneales frecuentes para administrar el CCl_4 provocaran un estado inflamatorio crónico y capaz de generar la síntesis y liberación del Mediador Endógeno que, sin embargo, no se presentó debido a la presencia de mecanismos adicionales que impidieron una disminución mayor en los niveles séricos del catión.

En forma contraria al comportamiento del zinc, en la Respuesta de Fase Aguda los niveles de cobre suelen incrementarse. Este hecho se ha explicado por el aumento concomitante que presentan los niveles séricos de ceruloplasmina, una glicoproteína con un peso molecular de 132,000 y una vida media de 13 hr en la rata y cuya función es la de transportar al cobre, amén de algunas funciones de defensa que explican su notable aumento (142).

En la cirrosis hepática ocurre un aumento en los niveles séricos y tisulares de cobre (143), aún cuando existe controversia en torno a si este aumento ocurre debido a una alteración en el mecanismo de excreción del cobre a través de la bilis en forma exclusiva o bien si existen mecanismos alternativos (144-145). Nuestros resultados indican niveles de cobre que aumentan cuando se aplica un estímulo inflamatorio en los grupos de ratas sanas. En el grupo de ratas con daño hepático sin inflamación fue posible apreciar niveles aumentados en relación a los observados en el

grupo de ratas sanas y sin inflamación. Cuando se aplicó un estímulo inflamatorio a las ratas con daño hepático prácticamente no se observó diferencia en los niveles séricos de cobre en comparación a los valores de las ratas con daño hepático pero sin inflamación. La interpretación de estos resultados es similar a la discutida para los niveles séricos de zinc, ya que si bien podría inferirse una alteración en el Mediador Endógeno Leucocitario como una explicación de la prácticamente nula variación en los niveles de cobre no es posible excluir la participación de factores compensatorios asociados que impidan un aumento mayor a los niveles observados.

Por otra parte, en los grupos de ratas sanas fué clara una alta correlación entre los niveles de zinc y cobre, la cuál se mantuvo en el grupo de ratas sanas más inflamación, lo cuál es de esperar que ocurriese en la Respuesta de Fase Aguda. En los grupos de ratas con daño hepático, en cambio, la relación tendió a hacerse negativa y la explicación de la variación en función de una u otra variable fué muy pobre. Resulta incierto interpretar la relación entre estas dos variables, si tomamos en cuenta el estado basal alterado que se presenta en la enfermedad hepática crónica en lo que se refiere a estos dos cationes. Sin embargo, es notable la diferencia en la forma de responder de la rata sana cuando enfrenta un estímulo inflamatorio y la forma en que lo hace, en las mismas circunstancias, la rata con daño hepático.

Por otro lado, se han informado aisladamente datos que apoyan

una respuesta de características normales en lo que se refiere a la síntesis hepática de algunas de las proteínas de Fase Aguda. Uno de estos estudios se realizó en ratas con daño hepático y en condiciones de inflamación (128-129). Sin embargo, es conveniente puntualizar que, el componente de la IL-1 al que se le atribuyen estos efectos, es al Mediador Endógeno Leucocitario. En relación a este punto tenemos un aspecto de interés. En la presente investigación se aborda al Mediador Endógeno Leucocitario por medio de su participación en la regulación de los cationes divalentes. Nuestros resultados sugieren una alteración en la respuesta derivada del Mediador Endógeno Leucocitario, situación que no corresponde con los resultados derivados del estudio citado arriba en el que el modelo animal y experimental es similar al empleado en nuestra investigación. Sin embargo los eventos de resultado o variables de interés en ambos estudios son diferentes. Así, mientras que en el primer estudio se registran los niveles de proteínas de fase aguda como el evento de interés, en nuestro estudio dicha variable fueron los niveles séricos de los cationes divalentes. Si bien ambos tipos de variables parecen depender del control del Mediador Endógeno Leucocitario no sabemos si dicha regulación es independiente para ambas, en cuyo caso no podríamos hablar de divergencias entre nuestros resultados y los del estudio citado dado que no serían comparables. En el caso, hipotético aún, de que las respuestas para ambas variables fueran dependientes entre sí, estaríamos hablando de una discrepancia. Para resolverla, en estudios futuros deberán registrarse ambos

tipos de respuestas en el mismo experimento con objeto de establecer su grado de asociación.

Además de estimular la salida de los neutrófilos a la circulación, la IL-1 favorece un aumento en la actividad metabólica de los mismos.

Los fagocitos mononucleares se originan en la médula ósea a partir de la célula pluripotencial, salen a la circulación como monocitos, donde permanecen durante un lapso de 24 hr aproximadamente, para pasar posteriormente a los tejidos donde se transforman en macrófagos. Debe considerarse que de acuerdo al órgano al que se dirigen, ésto determinará sus características metabólicas; de este modo, el macrófago alveolar tendrá una mayor capacidad de oxidación y el macrófago peritoneal tendrá una mayor capacidad de actuar en anaerobiosis (148). Dos hechos destacan en el funcionamiento global de los macrófagos : por una parte, fagocita al germen, lo digiere y produce moléculas que integra a su membrana, para de esta forma transmitir información respecto de dicho antígeno a los linfocitos T. Por otro lado, el macrófago produce una molécula, la interleucina 1, la cuál actúa sobre el linfocito y sirve para reforzar dicha transmisión de la información. El primer aspecto fué explorado en este estudio mediante la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio, la cuál nos proporciona una idea general de parte del proceso de fagocitosis. Nuestros resultados no mostraron diferencias entre el grupo de ratas sanas más inflamación cuando se comparó con el

grupo de ratas con daño hepático en las mismas condiciones de inflamación. Sin embargo, los valores en promedio para las ratas con daño hepático tendieron a ser menores que para las ratas sanas lo que resultaría consistente con una posible disminución en la eficiencia de la fagocitosis como ha sido descrito en cirrosis hepática.

Dado que la influencia de IL-1 sobre la fagocitosis ha sido atribuida al Factor Activador de Linfocitos, estos resultados además de los obtenidos en este estudio para el ensayo de proliferación de timocitos, función también dependiente del FAL, apoyan sin embargo, el hecho de que las ratas con daño hepático producen una cantidad similar del Factor Activador de Linfocitos en relación a las ratas sanas.

Al analizar los índices de función fagocítica kappa y delta se mantuvo la similitud en los resultados obtenidos en ambos grupos de ratas, haciéndose evidente que esta similitud estuvo dada debido a una mayor dispersión en los resultados del grupo de ratas con daño hepático, donde se obtuvieron tanto los valores más altos como los más bajos.

En conclusión :

Las ratas con daño hepático parecen producir cantidades similares del Factor Activador de Linfocitos en comparación con las ratas sanas.

Las ratas con daño hepático presentan alteraciones en algunos de los factores dependientes del Mediador Endógeno Leucocitario.

La Respuesta de Fase Aguda en las ratas con daño hepático y un proceso inflamatorio agregado se presenta en forma alterada y heterogénea cuando se compara con la que se observa en las ratas sanas en condiciones similares de inflamación.

Apéndice 1.

Estudio piloto realizado en forma previa a ala investigación con el fin de definir las condiciones de obtención de daño hepatocelular e inflamación..

Se formaron 5 grupos de 6 ratas cada uno de ellos, de la misma especie, sexo, edad y peso a las utilizadas en la investigación subsecuente. En la tabla 13 se describen los grupos de acuerdo a la dosis de CCl₄ administrada, la vía de administración y la relación aceite mineral/CCl₄. (El aceite mineral se utilizó como vehiculo) Uno de los grupos se utilizó como control y en él se aplicó únicamente solución salina. Todas las ratas se sacrificaron y se evaluaron 3 días después de la sexta aplicación. En todos los casos la administración se efectuó dos veces por semana. (lunes y viernes)

Resultados :

- 1.- La mortalidad fué mayor en las ratas a las que se administró el CCl₄ por vía intraperitoneal. En las ratas a las que se administró el CCl₄ por vía subcútanea no se obtuvo ninguna muerte. (p = 0.01) (gráfica 14a)
- 2.- En lo que se refiere a la mortalidad por grupos : en el grupo 3, en el que la administración del CCl₄ se realizó por vía subcútanea y el grupo 5 en el que se administró solución salina por vía intraperitoneal la mortalidad estuvo ausente. El grupo 1 y el grupo 4 tuvieron una mortalidad similar (16 %); En éste último

grupo todas las aplicaciones se efectuaron por vía intraperitoneal, en el primer grupo, en cambio, la mitad de las inyecciones fueron por vía intraperitoneal y el resto se realizó a través de la vía subcutánea. En el grupo 4 además, la administración del CCl₄ se realizó en forma más diluida. La mortalidad más alta se observó en el grupo de ratas en que todas las aplicaciones se hicieron por vía intraperitoneal a la dilución usualmente recomendada. (gráfica 14b).

3.- En el examen histopatológico se utilizaron para este estudio, dos parámetros para evaluar el daño hepático : la esteatosis y la necrosis. La esteatosis se valoró en una escala de medición ordinal : de una a cuatro cruces, de la siguiente forma :

1+ cuando se observaban de 0 a 25 % de células hepáticas con depósitos de grasa por campo; 2+ cuando se encontraban estos depósitos en el 26 a 50 % de los hepatocitos; 3+ cuando entre el 51 y el 75 % de las células hepáticas tenían esta característica y 4+ cuando se observaban depósitos grasos en más del 76 % de los hepatocitos. Hubo evidencia de mayor grado de esteatosis en aquellos grupos de ratas que recibían el CCl₄ por vía intraperitoneal, menor en el que recibió una administración combinada de las dos vías y menor aún en el grupo que recibió exclusivamente la vía subcutánea. (gráfica 14d).

En base a estos resultados se optó por trabajar con la administración intraperitoneal debido a la mayor rapidez con que genera el daño hepático. Si bien en nuestro estudio la dilución

aceite/CCl₄ de 2/1 produjo la menor mortalidad en los grupos de ratas a las que se administró CCl₄. se decidió utilizar la dosis usualmente recomendada en la literatura a fin de obtener una mayor comparabilidad en las técnicas utilizadas y además con el objeto de no aumentar la cantidad total administrada.

TABLA 13 Descripción de los grupos de ratas en relación a la dosis total, vía de administración y proporción de CCl-4 utilizado.

grupos	n	vía de administración	relación CCl-4/aceite
I	6	intraperitoneal/subcútea*	1 / 1
II	6	intraperitoneal	1 / 1
III	6	subcútea	1 / 1
IV	6	intraperitoneal	1 / 2
V	6	intraperitoneal	sol. salina

* La vía de administración se utilizó alternativamente

(estudio piloto)

gráfico 14a

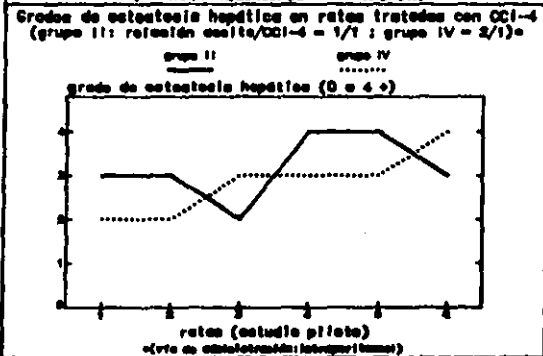
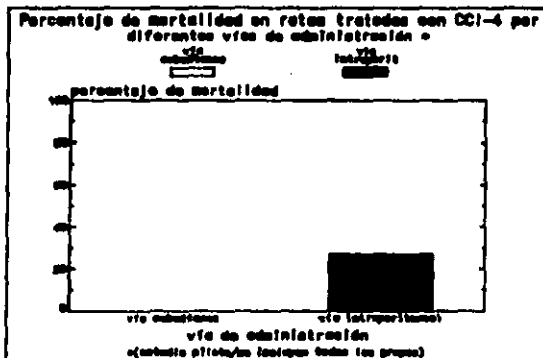
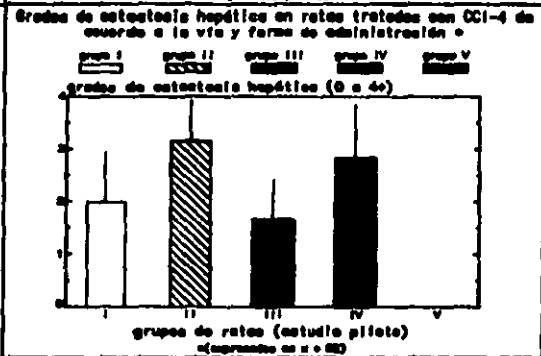
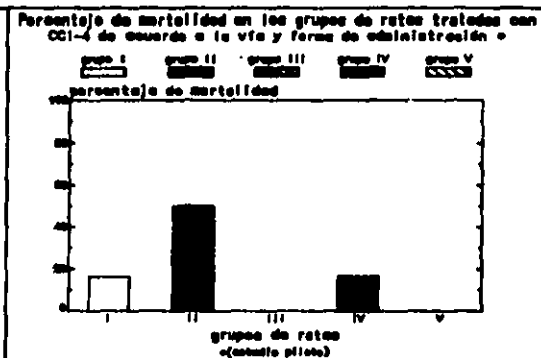


gráfico 14c

gráfica 14b



gráfica 14d

Apéndice 2.

INDICE DE TABLAS :

	página
tabla 1	Curvas de proliferación de timocitos expresadas como promedios de los valores obtenidos para cada dilución 44
tabla 2	Análisis de varianza para las curvas de proliferación de timocitos entre los diversos grupos de ratas 46
tabla 3	Análisis de varianza para las curvas de proliferación de timocitos en los grupos de ratas sanas con inflamación 50
tabla 4	Análisis de varianza para las curvas de proliferación de timocitos en los grupos de ratas con daño hepático e inflamación 51
tabla 5	Distribución de los valores de zinc y cobre en los diversos grupos de ratas 52
tabla 6	Análisis de varianza de los niveles séricos de zinc en los diversos grupos de ratas 54
tabla 7	Análisis de varianza de los niveles séricos de cobre en los diversos grupos de ratas 56
tabla 8	Correlación entre los niveles séricos de zinc y cobre en los diversos grupos de ratas 60
tabla 9	Unidades de densidad óptica obtenidos a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio en los diversos grupos de ratas 62
tabla 10	Análisis de varianza para los valores de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio 63
tabla 11	Indice kappa a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio 64
tabla 12	Indice delta a partir de la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio 67
tabla 13	Descripción de los grupos de ratas. Estudio piloto 82

INDICE DE GRAFICAS :

	página
gráfica 1	Curvas de proliferación de timocitos para todos los grupos 45
gráfica 2	Curvas de proliferación de timocitos comparaciones entre los grupos 47
gráfica 3	Proliferación de timocitos en promedio +/- DE en los grupos de ratas sanas y con daño hepático 48
gráfica 4	Proliferación de timocitos en promedios dentro de cada uno de los grupos 49
gráfica 5	Niveles séricos de zinc en los diversos grupos de ratas 53
gráfica 6	Niveles séricos de cobre en los diversos grupos de ratas 55
gráfica 7	Niveles séricos de zinc y cobre expresados en promedios para cada uno de los grupos 57
gráfica 8	Correlación entre zinc y cobre séricos en los grupos de ratas sanas 58
gráfica 9	Correlación entre zinc y cobre séricos en los grupos de ratas con daño hepático .. 58
gráfica 10	Correlación entre zinc y cobre séricos dentro de cada uno de los grupos 59
gráfica 11	Reducción del nitroazul de tetrazolio comparaciones entre grupos 61
gráfica 12	Reducción del nitroazul de tetrazolio expresado a través del índice kappa 65
gráfica 13	Reducción del nitroazul de tetrazolio expresado a través del índice delta 66
gráfica 14	Esteatosis hepática y mortalidad en los diversos grupos de ratas. Estudio piloto .. 83

X. BIBLIOGRAFIA :

- 1.- Guillemin,R.A personal reminiscence of Hans Selye. Lab. Invest. 1983;48:367.
- 2.- Selye.H. General adaptation syndrome and disease of adpotation. J.Clin.Endocrinol. 1946;6:117.
- 3.- De la Fuente,M.R. La base neural de los procesos mentales; Las emociones. La conciencia. en De La Fuente.M.R. Psicología Médica. FCE. 1a ed. 1959. pág:89.
- 4.- Dinarello,Ch.A.Interleukin-1 and the pathogenesis of the Acute-phase response.N.Eng.J.Med. 1984;311:1413.
- 5.- Dinarello,Ch.A. y S.M.Wolff.Pathogenesis of fever in man.N.Eng.J.Med. 1978;298:607.
- 6.- Dinarello,Ch.A. Production of endogenous pyrogen.Fed.Proc. 1979;38:52.
- 7.- Dinarello,Ch.A. Interleukin-1. Rev.Infec.Dis. 1984;6:51.
- 8.- Kluger,M.J. Phylogeny of fever. Fed.Proc. 1979;38:30.
- 9.- Aarden,L.A.; T.K.Brunner; J.C.Cerottini; J.M.Dayer; A.L.de Week;et al.Revised nomenclature for antigen-non specific T cell proliferation and helper factors.(letter). J.Immunol. 1979;123:2928.
- 10.- Reynolds,W.W.;M.E.Casterlin y J.B.Covert. Behaviorally mediated fever in aquatic ectotherms.en Lipton,J.M.;Fever. Raven Press,New York. 1980. pág:207.
- 11.- Beissel,W.R. y P.Z.Sobocinski. Endogenous mediators of fever related metabolic and hormonal responses. en Lipton,J.M.;Fever.Raven Press,New York.1980.pág:39.
- 12.- Fontana,A.;H.Henzartner;N.Tribelet y E.Weber. Glioblastoma cells release interleukin1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects.J.Immunol. 1984;132:1837.
- 13.- Hunninghake,G.W. Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. Am.Rev.Resp.Dis. 1984;129:569.
- 14.- Kobayashi,K.;C.Allred;S.Cohen y T.Yoshida.Role of interleukin 1 in experimental pulmonary granuloma in mice. J.Immunol. 1985;134:358.

- 15.- Luger, T.A.; R.M. Stadler; S.I. Katz y J.J. Oppenheim. Epidermal cell (paratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAFF). J.Immunol. 1981;127:1493.
- 16.- Mizel, S.B.; J.J. Oppenheim y D.L. Rosenstreich. Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF), Production by the macrophage cell line P388D1. I. Enhancement of LAF production by activated T cells. J.Immunol. 1978;120:1497.
- 17.- Ansel, J.T.; A.Luger; A.Kock; D.Hochstein y I.Green. The effects of in vitro UV irradiation on the production of IL 1 by murine macrophages and P388D1 cells. J.Immunol. 1984;133:1350.
- 18.- Lee, K.C.; M.Wong y D.McIntyre. Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines. J.Immunol. 1981;126:2474.
- 19.- Ruco, L.P. y M.S.Meltzer. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: increased lymphokine responsiveness of peritoneal macrophages during acute inflammation. J.Immunol. 1978;120:1054.
- 20.- Lee, K.C. y M.Wong. Functional heterogeneity of culture-grown bone marrow-derived macrophages: I Antigen presenting function. J.Immunol. 1980;125:86.
- 21.- Simon, P.L. y W.P. Willoughby. The role of subcellular factors in pulmonary immune function: physicochemical characterization of two distinct species of lymphocyte activating factor produced by rabbit alveolar macrophages. J. Immunol. 1981;126:1534.
- 22.- Mizel, S.B. Physicochemical characterization of lymphocyte-activating factor (LAF). J.Immunol. 1979;122:2167.
- 23.- Blyden, G. y R.E.Handschumacher. Purification and properties of human lymphocyte activating factor (LAF). J.Immunol. 1977;118:1631.
- 24.- Togawa, A.; J.J. Oppenheim y S.B. Mizel. Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by human mononuclear cells: biochemical relationship of high and low molecular weight forms of LAF. J.Immunol. 1979;122:2112.
- 25.- Dinarello, C.A. y S.M. Wolff. Molecular basis of fever in humans. Am.J.Med. 1982;72:799.
- 26.- Dinarello, C.A. Endogenous pyrogens. en Lipton, J.M.; Fever. - Raven Press, New York, 1980. pag:1.
- 27.- Chac, P.; L.Francis y E. Atkins. The release of an endogenous pyrogen from guinea pig leukocytes in vitro. J.Exp.Med. -

1977;145:1288.

89

- 28.- Mizel,S.B. y D.L.Rosenstreich. Regulation of lymphocyte activating factor (LAF) production and secretion in E388D1 cells:identification of high molecular weight precursors of LAF. J.Immunol. 1979;122:2173.
- 29.- Beer,D.J.;C.A.Dinarello;L.J.Rosenwasser y R.E.Rocklin. Human monocyte-derived soluble product(s) has an accessory function in the generation of histamine-and-concanavalin A induced suppressor T cells. J.Clin.Invest. 1982;70:393.
- 30.- Mitchell,D.;H.Laburn y J.Hattingh. Albumin fever. en Lipton,J.M.;Fever.Raven Press.New York. 1980.pág;23.
- 31.- Giri,J.G.;P.T.Lomedico y S.B.Mizel. Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin-1. J.Immunol. 1985;134:343.
- 32.- Black,R.A.;S.R.Kronheim;C.J.March y T.P.Hopp. Identification of two proteases potentially involved in IL-1beta processing. J.Cell.Biochem. 1988;supp 12B:282.
- 32a.- Dinarello,C.A.;G.H.A.Clowes,Jr.;H.Gordon;C.A.Saravis y S.M.Wolff. Cleavage of human interleukin 1:isolation of a peptide fragment from plasma of febrile humans and activated monocytes. J.Immunol. 1984;133:1332.
- 33.- Abbud-Filho,M.J.;W.Kupiec-Weslinski;J.L.Araujo; C.D.Heidecke; N.L.Tilney y T.B.Strom. Cyclosporine therapy of rat heart allograft recipients and release of interleukins (IL 1, IL 2, IL 3): A role for IL 3 in graft tolerance ?. J.Immunol. 1984;133:2582.
- 34.- Murphy,P.A.;P.L.Simon y W.F.Willoughby. Endogenous pyrogens made by rabbit peritoneal exudate cells are identical with lymphocyte-activating factors made by rabbit alveolar macrophages. J.Immunol. 1980;124:2498.
- 35.- Bernheim,H.A.;L.H.Block y E.Atkins. Fever i pathogenesis,pathophysiology, and purpoge. Ann.Intern.Med. 1979;91:261.
- 36.- Moore,D.M.;P.A.Murphy;P.J.Chesney y W.B.Wood,Jr. Synthesis of endogenous pyrogen by rabbit leukocytes. J.Exp.Med. 1973;137:1263.
- 37.- Bodel,P. Studies on the mechanism of endogenous pyrogen production. III. Human blood monocytes. J.Exp.Med. 1974;140:954
- 38.- Mizel,S.G. y D.Mizel. Purification to aparent homogeneity of murine interleukin 1. J.Immunol. 1981;126:834.
- 39.- Kampschmidt,R.F. Metabolic alterations elicited by endogenous pyrogens. en Lipton,J.M.;Fever.Raven Press.N.Y.1980.pág;49.

- 40.- Rosenwasser, L.J.; C.A. Dinarello y A.S. Rosenthal. Adherent - cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. - IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. 1979; J. Exp. Med. 150:709.
- 41.- Rosenwasser, L.J. y C.A. Dinarello. Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine - thymocyte proliferation. Cell Immunol. 1981;63:134.
- 42.- Wood, D.D. Purification and properties of human B cell activating factor I. Comparison of the plaque-stimulating activity with thymocyte-stimulating activity. J. Immunol. 1979; - 123:2395.
- 43.- Wood, D.D. Mechanism of action of human B cell-activating - factor. J. Immunol. 1979;123:2400.
- 44.- Mizel, S.B. Biochemical and biological characterization of - lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the murine - macrophage cell line, F3H8DL. Ann.N.Y. Acad. Sci. 1980;127:- 539.
- 45.- Krane, S.M. Collagenase production by human synovial - tissues. Ann.N.Y. Acad. Sci. 1975;256:289.
- 46.- Robinson, D.R.; M.B. McGuire y L. Levine. Prostaglandins in the - rheumatic diseases. Ann.N.Y. Acad. Sci. 1975;256:318.
- 47.- Coffey, R.G.; E.M. Hadden y J.W. Hadden. Evidence for cyclic - GMP and calcium mediation of lymphocyte activation by mi - togens. J. Immunol. 1977;119:1387.
- 48.- Klempner, M.S.; C.A. Dinarello y J.I. Gallin. Human leukocytic - pyrogen induces release of specific granule contents from - human neutrophils. J. Clin. Invest. 1978;61:1330.
- 49.- Baracos, V.; H.P. Rodemann; C.A. Dinarello y A.L. Goldberg. Sti - mulation of muscle protein degradation and prostaglandin - E₂ release by leukocytic pyrogen (interleukin-1) N. Eng. J. - Med. 1983;308:1553.
- 50.- Young, C.W. Studies on fever in neoplastic disease. en Linton, J.N.; Fever. Raven Press, New York. 1980. pag: 235.
- 51.- Dinarello, C.A.; S.O. Marnoy y L.J. Rosenwasser. Role of ara - chidonate metabolism in the immunoregulatory function of - human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/in - terleukin 1. J. Immunol. 1983;130:890.
- 52.- Kelly, J.P.; V.C. Johnson y C.W. Parker. Effect of inhibitors - of arachidonic acid metabolism on mitogenesis in human - lymphocytes: possible role of thromboxanes and products of - the lipoxygenase pathway. J. Immunol. 1979;122:563.

- 53.- Goodman, M.G. y W.O. Weisle. Modulation of lymphocyte activation. I. Inhibition by an oxidation product of arachidonic acid. J. Immunol. 1980;125:593.
- 54.- Milton, A.S. Evidence for the involvement of prostaglandins in pyrogen fever. en Linton, J.M.; Fever. Raven Press, New York. 1980. págs:141.
- 55.- Splawinsky, J.A.; Z. Gierka; E. Zaczay y B. Wojtasnek. Prostaglandins and fever in rats. en Linton, J.M.; Fever. Raven Press, New York. 1980. págs:149.
- 56.- Hellon, R.P.; V.I. Cranston; Y. Townsend; D. Mitchell; N.J. Dawson y G.M. Duff. Some tests of the prostaglandin hypothesis of fever. en Linton, J.M.; Fever. Raven Press, New York. 1980. págs: 159.
- 57.- Stobo, J.D.; M.S. Kennedy y M.E. Goldyne. Prostaglandin E modulation of the mitogenic response of human T cells. J. Clin. Invest. 1979;64:1188.
- 58.- Sullivan, T.J. y X.W. Parker. Possible role of arachidonic acid and its metabolites in mediator release from rat mast cells. J. Immunol. 1979;122:431.
- 59.- Goodwin, J.S.; R. DeHoratius; H. Israel; G.T. Penke y R.P. Messner. Suppressor cell function in sarcoidosis. Ann. Intern. Med. - 1979;90:169.
- 60.- Dinarello, C.A.; N.P. Goldin y S.M. Wolff. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. J. Exp. Med. 1974;139:1369.
- 61.- Kelly, J.P. y C.W. Parker. Effects of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. J. Immunol. 1979;122:1556.
- 62.- Puri, J.; M. Shinitzky y P. Lonai. Concomitant increase in antigen binding and in T Cell membrane lipid viscosity induced by the lymphocyte-activating factor, LAF. J. Immunol. - 1980;124:1937.
- 63.- Lipsky, P.E.; P.A. Thompson; L.J. Rosenwasser y C.A. Dinarello. The role of interleukin-1 in human B-cell activation: inhibition of B-cell proliferation and the generation of immunoglobulin secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. J. Immunol. 1983;130:1236.
- 64.- Dinarello, C.A.; L. Renfer y S.M. Wolff. The production of antibody against human leukocytic pyrogen. J. Clin. Invest. - 1977;60:465.
- 65.- Gilman, S.C.; J.S. Rosenber y J.D. Feldman. Inhibition of interleukin synthesis and T cell proliferation by a monoclo-

- nal anti-Ia antibody. J.Immunol. 1983;130:2708.
- 66.- Schwartz, P.H.; C.S.David; D.Sachs y W.B.Paul. T lymphocyte - enriched murine peritoneal exudate cells. III. Inhibition of antigen-induced T lymphocyte proliferation with anti-Ia antisera. J.Immunol. 1976;117:531.
- 67.- Acolla, R.A.; A.Moretta y J.C.Cerottini. Allogenic mixed lymphocyte reactions in humans: treatment of either the stimulator or the responder cell population with monoclonal anti-Ia antibodies leads to an inhibition of cell proliferation. J.Immunol. 1981;127:2438.
- 68.- Dinarello, C.A.; M.Shnarber; E.P.Kent, Jr y S.M.Wolff. Production of leukocytic pyrogen from phagocytes of neonates. J.Infect.Dis. 1981;144:337.
- 69.- Sauder, D.N.; H.L.Mounessa y S.I.Katz. Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell TGF in neutrophil chemotaxis. J.Immunol. 1984;126:2474.
- 70.- Bornstein, D.L. y E.C. Walsh. Endogenous mediators of the acute-phase reaction. I. Rabbit granulocytic pyrogen and its chromatographic subfractions. J.Lab.Clin.Med. 1978;91:236.
- 71.- Benson, M.D.; M.A.Aldo-Benson; T.Shirahama; Y.Borel y A.S.Cohen. Suppression of in vitro antibody response by a serum factor (SAA) in experimentally induced amyloidosis. J.Exp.Med. 1975;142:236.
- 72.- Wannemacher, R.W.; H.L.DuPont; R.S.Pekarek; M.C.Powanda; A.Schwartz; R.B.Hornick y W.R.Beisel. An endogenous mediator of depression of amino acids and trace metals in serum during typhoid fever. J.Infect.Dis. 1972;126:77.
- 73.- Sugarman, B. Zinc and infection. Rev.Infect.Dis. 1983;5:137.
- 74.- Klempener, M.S.; C.A.Dinarello; W.R.Henderson y J.I.Gallin. Stimulation of neutrophil oxygen-dependent metabolism by human leukocyte pyrogen. J.Clin.Invest. 1979;64:996.
- 75.- Chebrehiwet, B. y H.J.Müller-Eberhard. Glycan acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. J.Immunol. 1979;123:616.
- 76.- Clowes, G.H.A.; B.C.George; C.A.Villee y C.A.Saravis. Muscle proteolysis induced by a circulating peptide in patients with sepsis or trauma. N.Eng.J.Med. 1983;308:545.
- 77.- Whiteside, T.L.; J.G.Worrall; R.K.Prince; R.B.Buckingham y G.P.Rodnan. Soluble mediators from mononuclear cells increase the synthesis of glycosaminoglycan by dermal fibroblast

- cultures derived from normal subjects and progressive systemic sclerosis patients. Arth.Rheum. 1985;28:188.
- 78.- Fontana, A.; H. Hengartner; N. Tribolet y E. Weber. Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. J.Immunol. 1984;132:1837.
- 79.- Cohen, S. y T. Yoshida. Regulation of lymphokine function. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 1979;126:356.
- 80.- Gillissen, G. Influence of cefaclor on immune response parameters. Arzneimittelforsch. 1984;34:1535.
- 81.- Popper, H. Cirrosis hepática. en Wolpert, E. y D.Kershenovich Temas selectos de Hepatología, Ed. Interamericana, la.ed.1982 pág:223.
- 82.- LaMont, T.J.; R.S.Koff y K.J.Isselbacher. Cirrhosis. en Harrison, T.R. Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill. - 9a.ed.1980.pág:1473.
- 83.- Popper, H.; S.Sherlock; M.C.Leevy y M.I.Harris. Nomenclature-diagnostic criteria and diagnostic methodology for diseases of the liver and biliary tract. Fogarty International-Center Proceedings. No.22,1974.
- 84.- Strunin, L. Cirrosis. en Strunin, L. El hígado y la anestesia Salvat editores, la.ed.1981.pág:105.
- 85.- Thiel, D.H.; H.D.Lipsitz; L.E.Porter; R.R.Schade; G.P.Gottlieb y T.O.Graham. Gastrointestinal and hepatic manifestations of chronic alcoholism. Gastroenterol. 1981;81:594.
- 86.- World Health Statistics Annual; Organización Mundial de la Salud. 1976.
- 87.- Dajer, F.; L.Guevara; L.Arosarena; G.I.Suárez y D.Kershenovich Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México. 1978. Rev.Invest.Clin. 30:13.
- 88.- Santolaria, F.F.; M.P.Pestana; E.R.Gonzalez; N.L.Batista; J.J.-Hernández; I.M.González y L.N.Hernández. Factores pronósticos en la cirrosis hepática descompensada. Rev.Clin.Esp. - 1984;172:27.
- 89.- Russell, R.M. Nutritional deficiency in chronic liver disease. en Iber, F.L.; Treatable liver disease. McGraw, New York. - 1978. pág:34.
- 90.- Zetterman, R.K. y M.F.Sorrell. Immunologic aspects of alcoholic liver disease. Gastroenterol. 1981;81:616.
- 91.- Klitscky, A.L.; G.D.Friedman y A.B.Siegelaub. Alcohol and mortality. Ann.Intern.Med. 1981;95:139.

- 92.- Schlichting, P.; E. Christensen; L. Pauerholdt; H. Poulsen; E. -
E. Juhl y N. Tygstrup. Main causes of death in cirrhosis.
Scand. J. Gastroenterol. 1983;18:881.
- 93.- Bercoff, E.; C. Moreau; E. A. Pariente; J. Senant; D. Bastit; D. Mor-
camp y J. Bourreille. Les anticorps anti-bacille a gram né-
gatif au cours de la cirrhose alcoolique; Etude de 58 mala-
des. Gastroenterol. Clin. Biol. 1984;8:503.
- 94.- Pirovino, M.; E. Lydick; P. J. Grob; S. Arrenbrecht; J. Altorfer y M.
Schmid. Pneumococcal vaccination; The response of patients-
with alcoholic liver cirrhosis. Hepatology. 1984;4:946.
- 95.- Bretholz, A. Fever and liver cirrhosis. Schweiz. Med. Wochen-
schr. 1979;109:938.
- 96.- McGregor, R. R. Alcohol and immune defense. J.A.M.A. 1986; -
256:1474.
- 97.- Chaur-Young, Y.; L. Yun-Fan; C. Chia-Ming y S. I-Snyan. White -
count, pH and lactate in ascites in the diagnosis of spon-
taneous bacterial peritonitis. Hepatology. 1985;5:85.
- 98.- Pinto, J. C. y H. O. Conn. Peritonitis bacteriana espontánea -
en cirrosis; endémica o epidémica? Clin. Med. N.A. 1966;5:-
965.
- 99.- McNeil, N. I. y S. Buttoo. Spontaneous bacterial peritonitis -
due to campylobacter jejuni. Postgrad. Med. J. 1984;60:487.
- 100.- LeVeen, H. H. Ascites and its treatment. en Iber, F. L.; Treat-
table liver disease. Practical Gastroenterology. McGraw, -
New York. 1978. pág: 55.
- 101.- McFarlane, I. G.; A. L. W. P. Eddleston y R. Williams. Lymphocyte
subpopulations in chronic liver disease. Clin. Exp. Immunol.
1977;30:1.
- 102.- McKeever, U.; C. O' Mahony; C. A. Whelan; D. G. Weir y C. Feighery. -
Helper and suppressor T lymphocyte function in severe al-
coholic liver disease. Clin. Exp. Immunol. 1985;60:39.
- 103.- Popper, H. y R. Stern. Clinical implications of hepatic fi-
brosis. en Iber, F. L.; Treatable liver disease. Practical -
Gastroenterology. McGraw, New York. 1978. pág: 30.
- 104.- Wolpert, E.; G. Robles; S. Poucell; G. Rosel; E. Villarreal y E. L.
Flores. Hepatitis alcoholica aguda. Rev. Invest. Clin. 1978
30:3.
- 105.- Mendenhall, C. L.; S. Anderson; R. E. Weesner; S. J. Goldberg y K. A.
Grolic. Protein-calorie malnutrition associated with al-
coholic hepatitis. Am. J. Med. 1984;76:211.

- 106.- Wahl, S.M. y L.M.Wahl. Lymphokine modulation of connective tissue metabolism. Ann.N.Y.Acad.Sci.1980:411.
- 107.- Matsuda, Y. y G.S.Lieber. Ultrastructure of perivenular - sclerosis (PS) in alcoholic liver injury in the baboon. (abstract) Gastroenterol.1979;76:1292.
- 108.- Pérez-Tamayo, R.; I.Montfort; E.González y E.Tello. Colágenas y cirrosis hepática. Gac.Méd.Méx.115:161.
- 109.- Wickramasinghe, S.N. Role of macrophages in the pathogenesis of alcohol induced tissue damage. Br.Med.J. 1987;294: 1137.
- 110.- Teppo, A.M. y G.P.Maury. Prealbúmina sérica, transferrina e inmunoglobulinas en hígado sano, cirrosis alcohólica y cirrosis biliar primaria. Clin.Chim.Acta. 1983;129:279.
- 111.- Adolph, L. y R.Lorenz. Diagnóstico enzimático de las hepatopatías. en Adolph, L. y R.Lorenz.; Diagnóstico enzimático en las enfermedades de corazón, hígado y páncreas. Ed. S. Karger. La.ed. 1980.págs:81.
- 112.- Kent, G. y K.A.Schneider. Cirrosis y sobrecarga de hierro. en Schaffner, P.; S.Sherlock y G.M.Leevy. El Hígado y sus enfermedades. Ed. Científico-Médica.la.ed. 1978.págs:371.
- 113.- Baer, M.T. y J.C.King. Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. Am. J.Clin.Nut. 1984;39:556.
- 113a.- Milman, N.; K.Hvid-Jacobsen; J.Hernhoj y S.Solvsten-Sorensen. Zinc absorption in patients with compensated alcoholic - cirrhosis. Scand.J.Gastroenterol. 1983;18:871.
- 114.- Konrad, H. Hepatogenic anemia. Z.Gesamte. Inn.Med. 1983;38: 78.
- 115.- Rosenblueth, A. Los modelos científicos. en Rosenblueth, A. El Método científico. La Prensa Médica Mexicana.la.ed. - 1971.págs:70.
- 116.- Tsukamoto, H.; S.W.French; N.Benson; G.Delgado; A.Rao; E.C.Larkin y C.Largman. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. Hepatology. - 1985;5:224.
- 117.- Lieber, C.S. Alcohol e hígado. en Wolpert, E. y D.Kershenovich.; Temas selectos de hepatología. Ed. Interamericana. - la. ed. 1982.págs:1.
- 118.- French, S.W.; B.H.Ruebner; E.Mezey; T.Tamura y C.H.Halsted. - Effect of chronic ethanol feeding on hepatic mitochondria

- in the monkey. Hepatology. 1983;3:34.
- 119.- Leo, M.A. y G.S.Lieber. Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. Hepatology. 1983;3:1.
- 120.- French, S.W.; N.C.Benson y P.S.Sun. Gentrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed rats. Hepatology. 1984;4:912.
- 121.- Field, F.J.; J.S. Boydston y D.R.LaBrecque. Effect of chronic ethanol ingestion on hepatic and intestinal acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase and 3-Hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the rat. Hepatology. 1985;5:133.
- 122.- Bernusau, D.; E.Rogier y G.Feldman. Decreased albumin and increased fibrinogen secretion by single hepatocytes from rats with acute inflammatory reaction. Hepatology. 1983;3:29.
- 123.- Hambrich, W.S. Lesiones hepáticas inducidas por agentes químicos y fármacos. en Bockus, H.L.; Gastroenterología. 3a.ed.; Salvat.Ed.1980.págs:355.
- 124.- Pérez-Tamayo, R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? Hepatology. 1983;3:112.
- 125.- Dan, M.; A.Hammer; M.Jedwab y S.Shibolet. Development of Hodekin's disease in the course of liver cirrhosis and impaired monocyte function. Postgrad.Med.J. 1984;60:482.
- 126.- Sakamoto, S.; S.Koga y H.Ibayashi. Interleukin 1 activity in culture supernatant of lipopolysaccharide-stimulated monocytes from patients with chronic liver disease. Hepatogastroenterol. 1984;31:248.
- 127.- McClain, C.J.; D.A.Cohan y A.Kaplan. Increased serum interleukin-1 (IL-1) levels in alcoholic hepatitis. (abstract)-Gastroenterol. 1985;92:1677.
- 128.- Kirsch, R.E. y J.J.Franks. Fibrinogen synthesis in the isolated perfused rat liver: stimulation by a humoral factor associated with trauma. Hepatology. 1982;2:205.
- 129.- Feldmann, G. Synthesis and secretion of acute phase proteins by the hepatocytes from rats with normal liver or cirrhosis during the inflammatory reaction. J.Exp.Med. 1983;152:446.

- 130.- Kalsted, J.A.; H.A. Ronaghy y P. Abadi. Zinc deficiency in man; the Shiraz experiment. Am. J. Med. 1972; 53: 277.
- 131.- Prasad, A.S. y D. Oberleas. Thymidine kinase activity and incorporation of thymidine into DNA in zinc deficient tissue. J. Lab. Clin. Med. 1974; 83: 634.
- 132.- Zanzonico, T. The differential sensitivity of T-cell and B-cell mitogenesis to in vitro zinc deficiency. Cell. Immunol. 1981; 60: 203.
- 133.- Antonsen, D.L. y J.A. Venderhoof. Effect of chronic ethanol ingestion on zinc absorption in rat small intestine. Dig. Dis. Sci. 1983; 28: 605.
- 134.- Vanderhoof, J.A.; J.H.Y. Park y C.J. Grandjean. Zinc and the mucosa. Gastroenterol. 1987; 92: 1271.
- 135.- Valberg, L.S.; P.R. Flanagan; C.N. Ghent y M.J. Chamberlain. Defect in zinc absorption in alcoholic cirrhosis. Gastroenterol. 1983; 89: 1339.
- 136.- Chandra, R.K. Excessive intake of zinc impairs immune response. J.A.M.A. 1984; 252: 1443.
- 137.- Allen, J.I.; N.E. Kay y C.J. McClain. Severe zinc deficiency in humans associated with a reversible T-lymphocyte dysfunction. Ann. Intern. Med. 1981; 95: 154.
- 138.- Weismann, K.; E. Christensen y V. Dreyer. Zinc supplements in alcoholic cirrhosis. Acta. Med. Scand. 1979; 205: 361.
- 139.- Fraker, P.J.; C.M. Zwicky y R.W. Luecke. Delayed type hypersensitivity in zinc deficient adult mice: impairment and restoration of responsiveness to dinitrofluorobenzene. J. Nutr. 1982; 112: 309.
- 140.- Keeling, P.W.N.; R.B. Jones; P.J. Hilton y R.P.H. Thompson. Reduced leucocyte zinc in liver disease. Gut. 1980; 21: 561.
- 141.- Anttinen, H.; A. Oikarinen; U. Puistola; P. Pihlkkö y L. Ryhänen. Prevention by zinc of rat lung collagen accumulation in carbon tetrachloride injury. Am. Rev. Respir. Dis. 1985; 132: 536.
- 142.- Kressner, M.S.; R.J. Stockert; A.G. Morell y I. Sternlieb. Origins of biliary conner. Hepatology. 1984; 4: 867.
- 143.- Mezey, E. Copper storage disease, on Iber; F.L.; Treatable liver disease. Practical Gastroenterology. McGraw, New York. 1978, ndg: 45.
- 144.- Raedsch, R.; A. Stiehl; R. Waldherr; U. Gundert-Remy; S. Walker y B. Kommerell. Biliary excretion of iron and copper in healthy man and in patients with alcoholic cirrhosis. Gastro-

- enterol. (abstract). 1983;89:1391.
- 145.- Carr,W.P. Acute-phase proteins. Clin.Rheum.Dis. 1983;9:227.
- 146.- Benitez-Bribiesca,L.;R.Freyre-Horta y S.Mejia. The effect of intermediate respiratory chain inhibitors upon the tetrazolium-reductase activity of human polymorphonuclear leukocytes. Life Sciences 1975;16:967.
- 147.- Bafner,R.L. y D.G.Nathan. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N.Eng.J.Med. 1968;278:971.
- 148.- Rojas,M.W.Inflamación en Rojas,M.W. Inmunología. Editorial Fondo Educativo Interamericano. 5a. ed. 1978. pag: 51-70.
- 149.- Wing,E.J. y J.S.Remington. Hipersensibilidad retardada y funciones de los macrófagos. en Fudenberg,H.H.;D.P.Stites;J.L.Caldwell y J.V.Wells. Inmunología Clínica. 2a. ed. 1980. pag: 103-119.