



37
209

Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"Z A R A G O Z A"

RESPUESTA INMUNOLOGICA EN PACIENTES
ALCOHOLICOS CRONICOS.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Titulo de:

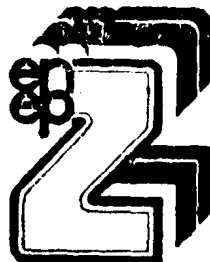
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

MARIA DEL PILAR MOLINA HUARACHA

México, D. F.

1986





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

DEDICATORIAS.	I-IV
INTRODUCCION	1-8
OBJETIVOS	9
HIPOTESIS	10
FUNDAMENTACION DEL TEMA	11-19
MATERIAL Y METODOS	20-24
RESULTADOS	25-33
DISCUSION	34-37
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39-44

I N T R O D U C C I O N

El hombre siempre se las ha ingeniado para producir bebidas alcohólicas. El alcoholismo no era considerado como una enfermedad, sino hasta que aproximadamente en el año de 1800- cuando el médico Thomas Trotter se refirió a él en este sentido.(1)

Actualmente existen diversos conceptos del alcoholismo - los cuales dependen de los criterios considerados por las -- ciencias biológicas y sociales que auxilian a su estudio. Debido a la diversidad de definiciones, para los fines de este trabajo sólo se consideraron tres: (1,2)

1. La Organización Mundial de la Salud postula, "El alcoholismo es una enfermedad crónica, caracterizada por la ingestión repetida de bebidas alcohólicas causando perjuicio a la salud del bebedor, a sus relaciones con -- otras personas y su actividad económica".(2)
2. Jellinek establece " El alcoholismo es cualquier uso de bebidas alcohólicas que causa daño al individuo, a la - sociedad o a ambos".
3. Hanlon dice que: "desde el punto de vista epidemiológico, el alcoholismo puede ser definido como una enfermedad adquirida, crónica, progresiva en la vida(adulta),- caracterizada por la ingestión compulsiva de cantidades excesivas de alcohol que conduce en los estadios más - avanzados de la enfermedad a ciertas secuelas de deterioro psicológico, social y físico.

Después del agua, la molécula que quizá cuente con mayor atractivo para el hombre es el etanol debido a que su ingestión provoca respuesta temprana de tipo placentero en el sistema nervioso central debido a su acción anestésica. Tiene una fórmula general de $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, con punto de ebullición y punto de fusión de 78°C y -115°C respectivamente. Se obtiene mediante la fermentación y destilación de una gran variedad de productos vegetales como son: cereales, papa, caña de azúcar, uvas etc. También es producido endógenamente por la flora intestinal pero esto ocurre en cantidades minúsculas. Tiene un valor calórico de 0.7 Kcal/g que es superior a los carbohidratos e inferior a los lípidos.(1,2,3,)

Al etanol se le considera con un anestésico comparable con el éter y cloroformo que deprime el sistema nervioso central y no es estimulante como anteriormente se creía.(3,4,5) Cuando un individuo lo ingiere, presenta signos de intoxicación que son muy variables y dependen principalmente de las cantidades y el tiempo en que se consuma como se observa en el cuadro 1 y en la tabla 1. El consumo excesivo puede provocar dos tipos de intoxicación, aguda y crónica. En la aguda se observa un estado de coma, piel fría y húmeda, respiración lenta, temperatura disminuída, taquicardia, baja de la presión arterial, vasodilatación cerebral y no causa cirrosis; la crónica se caracteriza principalmente por trastornos gastrointestinales y neurológicos.(1,6,7)

Una vez que es ingerido el alcohol, el 80% es absorbido

en forma intacta por el esófago, el resto se absorbe en el estómago. Su presencia en la sangre se puede demostrar 5 minutos después de la ingesta y la concentración máxima se alcanza entre la media hora a dos horas, dependiendo de la concentración y cantidad ingerida.(3,6) Circula proporcionalmente por el plasma sanguíneo para llegar a los órganos distintos del cuerpo. Se elimina casi en su totalidad mediante procesos de oxidación en el hígado(90-98%) y un 2% a través de la piel y pulmones.(2,3) Esto hace que el etanol se convierta en una carga energética para el hígado, por lo cual al verse obligado a manejarla modifica su metabolismo general.(3)

La oxidación del etanol se realiza en dos compartimientos celulares: el citoplasma y la mitocondria. En el citoplasma puede ocurrir en 3 sistemas principales:

- a) Sistema del alcohol deshidrogenasa.
- b) Sistema de oxidación microsomal.
- c) Acción de la catalasa.

La primera de ellas metaboliza prácticamente todo el etanol cuando las concentraciones son moderadas y más del 70% cuando son altas. La alcohol deshidrogenasa no es específica para el etanol. La oxidación del etanol por el sistema microsomal es relativamente pobre cuando las concentraciones séricas del etanol son bajas, tampoco tiene una especificidad grande por el mismo. La oxidación de la enzima catalasa para el etanol es casi nula.

En cualquiera de las tres vías mencionadas el primer me-

tabolito es el acetaldehído que viaja a la mitocondria, donde la enzima acetaldehído deshidrogenasa lo convierte en acetato. El acetato puede ser activado a acetyl Co-A y utilizado por el hígado u otros tejidos o bien ser convertido a CO_2 y H_2O . La velocidad con que se lleva a cabo este proceso es constante (cuadro no. 2)

In vivo la inhibición de la aldehído deshidrogenasa trae como consecuencia la acumulación de acetaldehído en sangre -- por lo que el individuo puede sufrir náuseas, vómitos, hipertensión y aún provocar la muerte. (2,4,6)

Aunado a la ingestión de alcohol se puede observar algunos cambios a nivel celular y bioquímico por ejemplo: alteraciones en las membranas plasmáticas de células de la mucosa del yeyuno, lo que provoca una disminución en el transporte de glucosa y aminoácidos y un decremento en la síntesis de -- proteínas inhibitoras de la hormona antidiurética de la neurohipófisis.

Elevación sérica de Na^+ y K^+ y una disminución de zinc, -- así como aumento en los niveles séricos de ácidos grasos y -- triglicéridos, tal vez por la disminución de los niveles de -- NAD, ya que gran parte de este último se utiliza en el metabolismo del etanol.

Uno de los órganos que se ven más afectados por la ingesta de etanol es el hígado, ya que el consumo de alcohol afecta notablemente el metabolismo lipídico conduciendo a un acúmulo de triglicéridos. Además existen otras alteraciones por

la ingesta crónica del etanol como son la hepatitis alcohólica y la cirrosis. Hay algunas evidencias que señalan la generación secuencial de hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis, sin embargo, aún distan mucho de conocerse los mecanismos que expliquen satisfactoriamente esta evolución.

Se conoce el daño ocasionado por el etanol y sus metabolitos a nivel celular donde afecta principalmente al citoplasma, retículo endoplásmico liso (REL) y mitocondrias. Las alteraciones mitocondriales observadas son crecimiento, alteraciones en su forma, pocas o ninguna crestas e inclusiones cristalinas. También existe una degeneración focal del citoplasma, aunado a una degeneración fibrilar del mismo: cuerpos laminares intravacuolares, figuras mielínicas intracitoplasmáticas dando la impresión de una citolisis parcial. También existe una hinchazón general del retículo. (8,9)

Así la ingesta de alcohol trae alteraciones en diferentes órganos y sistemas, aunque aún es incompleto el conocimiento sobre los mecanismos implicados en su patogenia de modo que se puedan tomar las medidas terapéuticas de prevención adecuada, a fin de detener el progreso de las consecuencias orgánicas del alcoholismo.

El hígado graso es la acumulación de triglicéridos en el hígado en cantidades suficientes como para ser visibles con microscopía de luz. A veces la infiltración grasosa del hígado obedece a una deficiencia de sustancias lipotrópicas secundarias de malos hábitos dietéticos, alcoholismo crónico,

defectos de absorción o desnutrición, provocada por determinados padecimientos consecutivos. En los casos de obesidad la infiltración grasosa prolongada parece predisponer a la cirrosis alcohólica.

La hepatitis alcohólica es un estado donde existe degeneración celular con presencia de cuerpos de Mallory hialinos (masas reticulares, perinucleares, eosinófilas), proliferación de los conductillos biliares y reacción inflamatoria aguda.

La cirrosis es una desorganización de la arquitectura -- del hígado por fibrosis y formación de lóbulos extensos, caracterizados por la alteración de la función hepática. Los nódulos son porciones de parénquima demarcados por tejido conectivo. En la cirrosis todas las partes del hígado tienen que estar afectadas, pero pueden encontrarse grandes nódulos.

La cirrosis hepática se define desde el punto de vista anatomico como:

- a) El proceso afecta a todo el hígado sin invadir necesariamente cada uno de los lobulillos.
- b) Hay necrosis celular en alguna etapa del padecimiento.
- c) Se encuentra regeneración nodular del parénquima.
- d) La fibrosis es de caracter difuso.
- e) Hay desorganización de la arquitectura lobulillar, con bandas de tejido conjuntivo, que unen las zonas centrolobulillares a los espacios portales.

Desde el punto de vista clínico se define como:

- a) Enfermedad de curso clínico.
- b) Insuficiencia hepática e hipertensión en la mayoría de los casos.

CUADRO No. 1

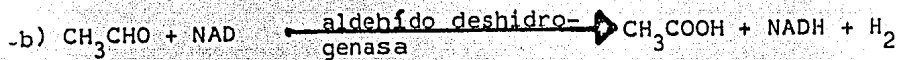
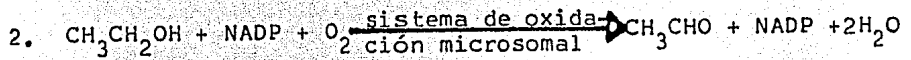
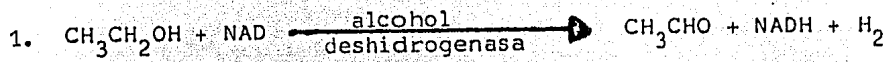
CONCENTRACION DE ETANOL	E F E C T O S
50-150 mg/dl =	Incoordinación, visión borrosa.
150-250 mg/dl =	Marcada hipoglicemia, especialmente en niños, visión deteriorada, temblorosa, palmas incoordinadas.
300-400 mg/dl =	Marcada incoordinación, estupor, hipoglucemia y convulsiones.
500 mg/dl ó más=	Coma y muerte, excepto en individuos tolerantes.

EFFECTOS MAS FRECUENTES DE LA INGESTA DE ETANOL, SEGUN EL VOLUMEN EN SANGRE.

TABLA No. 1

1a. Fase =	Etapa de oscurecimiento o amnesia alcohólica, es decir sufre lagunas mentales sin recordar lo que ocurrió durante cierto tiempo.
2a. Fase =	Etapa crucial o básica caracterizada por la pérdida del control, incapacidad de abandonar la -- costumbre de beber una vez adquirida.
3a. Fase =	Crónica, proceso acelerado de decadencia social y física, permanece en estado de embriaguez por varios días, crisis de desmoralización, alucinaciones, <u>delirium tremens</u> , tendencia a la clausuración.

FASES DEL ALCOHOLISMO.



CUADRO No. 2 SISTEMAS DE OXIDACION DEL ETANOL.

O B J E T I V O S

1. Medir in vitro la respuesta inmunológica específica en - pacientes alcohólicos crónicos comparada con la de individuos sanos.
2. Buscar si los cuerpos de Mallory actúan como un antígeno- en pacientes alcohólicos crónicos y no en individuos sa- nos.
3. Determinar la magnitud en que la ingesta de alcohol altera la capacidad de establecer una respuesta inmunológica celular.
4. Integrar, comparar e interpretar la información obtenida en las dos poblaciones (individuos sanos y alcohólicos.)

H I P O T E S I S

Los cuerpos de Mallory, cuya presencia es causada por la ingesta crónica de alcohol, inducen una respuesta inmunológica principalmente de tipo celular que en parte es responsable del daño hepático.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la patología de la cirrosis alcohólica. Así, el etanol podría tener un efecto directo en la liberación de material fibrogénico de los hepatocitos dañados con la consiguiente producción de colágena. También podría haber la participación de mecanismos inmunológicos desencadenados por la presencia de los cuerpos de Mallory que actuarían como autoantígenos.(11,25)

Mallory en 1911 describe una degeneración hialina del citoplasma de células hepáticas en pacientes con cirrosis alcohólica. Las estructuras asociadas se les denominó posteriormente como cuerpos de Mallory(CM). Las células con CM están rodeadas e invadidas por leucocitos que las destruyen y esta degeneración hialina fue asociada con una colestásis focal con degeneración de células del hígado y fibroplasia. Esta descripción morfológica de los cambios histológicos ha sido estudiada con más claridad y precisión, pero sin llegar a describir con exactitud la composición de estos CM, también conocidos como hialino alcohólico o hialino de Mallory.(10)

Leevy y Popeper observaron que la lesión histológica de la hepatitis alcohólica se caracteriza por necrosis hepatocelular, hialino alcohólico con o sin cambio de grasa.(11,12)

Estudios con microscopía electrónica indican que los cuerpos de Mallory están compuestos por filamentos derivados de proteínas normales constituyentes del citosol de las células hepáticas. Algunos los relacionan con la actina, así como

también presenta características fosfolipídicas, sin embargo esto no ha sido confirmado.(10,16)

Histoquímicamente hay proteínas básicas que son libres del grupo glicol cuya ultraestructura consiste de filamentos orientados paralelamente, sin membrana limitante y con apariencia de cuerda enrollada. Han sido relacionados con filamentos finos de retículo endoplásmico rugoso y con mitocondrias. No son proteínas homogéneas, sino son varias proteínas y un complejo lipoprotéico.(13,14,15)

Estudios inmunológicos y fisicoquímicos de los CM han sugerido que son filamentos intermedios de prequeratina. Sin embargo recientemente se ha llegado a la evidencia de que los CM no contienen un antígeno único y se ha visto que en células de hígado normal este antígeno es distinto a la prequeratina, esto no es claro por la complejidad en la estructura de los antígenos de los CM.(18,19,20)

Se ha observado infiltración de leucocitos polimorfonucleares(PMN) principalmente eosinófilos y mononucleares(MN) con predominio de linfocitos.(11,12) La infiltración linfocítica observada en la hepatitis activa crónica también se ha visto en la hepatitis alcohólica, sugiriendo que el etanol pueda ser una "droga inductiva" para causar la hepatitis activa crónica.(11) Leevy y colaboradores utilizando métodos inmunológicos demostraron la presencia del antígeno CM en células de pacientes en fase temprana de la hepatitis alcohólica, pero este antígeno no desaparece si o al cabo de 3 a 5 semanas de abstinencia de etanol.

Los CM no sólo son característicos de los alcohólicos crónicos sino que están presentes en otras enfermedades como son la obstrucción biliar extrahepática, la enfermedad de Willson, la abetalipoproteinemia, la hiperplasia nodular focal, el carcinoma hepatocelular y el daño hepatocelular inducido por drogas.

Otro aspecto importante en la mayoría de los pacientes con hepatitis alcohólica es que presentan infecciones frecuentes, en especial las infecciones bacterianas piogénicas que se sabe están bajo el control de los PMN. Se ha visto que la ingesta de etanol impide la movilidad de los PMN y también disminuye la adherencia granulocítica, lo cual se normaliza al ser retirado el etanol.(11,28) In vitro el alcohol también deteriora la quimiotaxis de granulocitos, la adherencia inmune y la fagocitosis.(29) Los pacientes con cirrosis alcohólica tienen alterada la quimiotaxis neutrofilica independientemente de la ingesta de etanol, así como también se vio que los granulocitos de pacientes con hepatitis alcohólica migraban normalmente ante suero de sujetos sanos pero no en suero de pacientes cirróticos.(30) Leevy y colaboradores han sugerido que los mecanismos inmunológicos (respuesta inmunológica celular y respuesta inmunológica humoral) son de gran importancia para el desarrollo de la cronicidad de las lesiones hepáticas y por ende de la formación de los CM. Lo anterior genera la hipótesis de que los CM sean considerados como un neoantígeno capaz de inducir la hiperreactividad linfocítica y esto se reconoce por

la disminución en la RIC en pacientes con hepatitis alcohólica.
(16,22,23)

Con respecto a la inmunidad humoral las alteraciones en pacientes alcohólicos no han sido frecuentemente descritas. El anticuerpo contra los CM fue encontrado sólo en pacientes con fase temprana de hepatitis alcohólica, pero en ningún paciente con hígado graso o cirrosis inactiva, ni en pacientes con otras formas hepáticas agudas. Al realizar estudios más detallados se encontro que las inmunoglobulinas contra los CM son tanto de la clase IgA como de la IgG.(31,32,34,35)

Otros investigadores mencionan un incremento policlonal -- desproporcionado de inmunoglobulinas IgA e IgG. Esta hipergammaglobulinemia se ha atribuído a un incremento de infecciones -- por bacterias y virus, así como por una respuesta inespecífica al daño tisular.(11,33) Otros estudios señalan que las inmunoglobulinas séricas no tienen un papel específico en las enfermedades hepatoalcohólicas. Berenyi encontró elevado sólo los niveles de IgM en pacientes con cirrosis alcohólica mencionando -- que puede actuar como anticuerpo bloqueador.(34)

Las alteraciones en la inmunidad mediada por células en pacientes con hepatitis alcohólica pueden ser apreciadas en tecnicas in vitro e in vivo. In vivo la tecnica utilizada es la inducción de hipersensibilidad tardía que presentan estos pacientes a diferentes substancias, la más común es la respuesta a dinitroclorobenceno(DNCB) en piel y se piensa que la reducción a este tipo de respuesta se debe a desórdenes inmunológicos y a --

deficiencias metabólicas de la desnutrición, sin embargo la -- respuesta se normaliza cuando hay recuperación clínica del paciente.(11,35) Berenyi observo en pacientes con enfermedades hepatoalcohólicas que el 20% desarrollan una reacción de hiper sensibilidad tardía cuando se les sensibilizó con 100 microgramos de DNCB. También mencionó una función defectuosa en los -- macrófagos en la generación de la prueba en piel cuando es negativo.(11,34,36)

Se ha observado que el valor de células T en sangre periférica disminuye considerablemente en pacientes con hepatitis-alcohólica, pero aumenta considerablemente el número de linfocitos intrahepáticos.(11,24,27) Esta linfopenia en la mayoría de los casos se presenta en pacientes con hepatitis alcohólica o cirrosis con ausencia de anemia, deficiencia de ácido fólico o de infección viral.(27)

Las alteraciones de las funciones en linfocitos T son: - disminución en la respuesta *in vitro* a mitógenos, reducción en la circulación de células T, un aumento de células T intrahepáticas, producción de linfocinas *in vitro* como respuesta a los CM y el incremento espontáneo de la citotoxicidad mediada por células *in vitro*. Las observaciones anteriores no han establecido aún si la causa definitiva de las enfermedades del hígado inducidas por alcohol es a través de mecanismos inmunológicos. Se considera que la hepatitis alcohólica es un paso intermedio en la patogenia de la cirrosis alcohólica pero se desconocen - los factores de susceptibilidad que la desencadenan.(11)

Para evaluar la actividad inmunológica en estos pacientes se ha utilizado la búsqueda del factor de inhibición(LIF), utilizando a los CM como antígeno, encontrando que existe una diferencia significativa en la producción de LIF en los pacientes con hepatitis alcohólica al compararlas con un grupo testigo y con un grupo con otras enfermedades del hígado.(22) Linfocitos de pacientes con hepatitis alcohólica pero no con hígado - graso o cirrosis inactiva secretan LIF en respuesta al hialino alcohólico. Pero cuando hay recuperación(establecida por criterios histológicos e inmunológicos), la producción de LIF cesa.(31) Otros investigadores al trabajar con el mismo antígeno encuentra que el 40% de pacientes con hepatitis alcohólica -- mostraron aumento en la producción de LIF, pero menciona que - el antígeno no fue absolutamente puro y que las sustancias utilizadas para disolver los CM fueron tóxicos para los leucocitos lo cual inhibe su migración.(22,31)

Estudios realizados por Actis y colaboradores(11), al adicionar acetaldéhdos a leucocitos de pacientes con hepatitis - alcohólica observaron una disminución en la producción de LIF, pero no en otras enfermedades relacionadas con la ingesta de - etanol. Otros autores mencionan que al agregar acetaldéhdido - a linfocitos de sangre periférica y en presencia de fitohema- glutinina(PHA) estos no responden, sin embargo en otro tipo de pacientes con enfermedades hepatoalcohólicas existe un aumento en tla transformación linfocítica in vitro. Por lo que se propone que la producción de LIF en respuesta a este metabolito -

se correlaciona estrechamente con la presencia histológica del hialino alcohólico. Esto concuerda con Zeeterman.(16) Estudios realizados que utilizan a los CM como antígeno para el LIF, Mencionan que no existe una diferencia significativa en un grupo testigo y otro de pacientes con hepatopatías.(22) Estos resultados negativos concuerdan con los de MC Sween.(14) Aunque es posible que se deba a razones metodológicas.

Algunos autores demostraron que los homogenizados de hígado autólogo de pacientes con hepatitis alcohólica estimulan la transformación linfocítica. Esto no fue observado en sujetos con hígado normal, hígado graso o cirrosis inactiva, sospechando que el hialino alcohólico puede ser responsable de la transformación blástica in vitro. Esta estimulación desaparece con la recuperación clínica e histológica del pacientes. Otros autores mencionan que las células T de estos pacientes muestran una disminución irreversible en su estimulación frente a la PHA.(11,22,23,24)

La transformación linfocítica de pacientes con hepatitis alcohólica en respuesta a PHA esta disminuida cuando presentan daño hepatocelular avanzado y esta reducción tiende a ser atribuida a la presencia de factores inhibitorios y la disminución en la circulación sanguínea de células T.(11,37)

Recientemente en un estudio preliminar se observó que la secreción de linfocinas puede provocar que los fibroblastos -- aceleren la síntesis de la colágena.(11,25) Otros investigadores encontraron que los CM son capaz de estimular la producción

de: factor de transferencia, factor quimiotáctico, linfocinas y factores fibrogénicos.(11,22)

La mayoría de los estudios relacionados para evaluar la citotoxicidad mediada por células es debida a células naturales asesinas. Algunos investigadores observaron que los linfocitos de pacientes con hepatitis alcohólica pero no los de hígado graso o cirrosis inactiva son citotóxicos para hepatocitos autólogos.(11) Leevy encontro lo mismo explicando que esta diferencia de citotoxicidad se relaciona con la composición de los CM y la necrosis hepatocelular. Esto sugiere la posibilidad de la citotoxicidad como un potencial para el daño progresivo del hígado. La metodología para demostrar este fenómeno son contradictorios y se necesita la confirmación con otros sistemas.(11,22,31,35)

Un fenómeno de gran interés es la presencia en estos pacientes de sustancias séricas inhibitoras(SIF). Estas se estudian por su efecto inhibitor de fenómenos inmunológicos in vitro. Así en la transformación blastoide con PHA se encontro una franca disminución en presencia de suero de sujetos con -- hepatitis alcohólica y cirrosis, efecto que aumenta de acuerdo al daño hepático y probablemente a la falta de sustancias en el cultivo. Esta inhibición causada por el suero de alcohólicos es de vital importancia in vivo.(39,40) Aunque con el -- uso de suero precalentado se fracasó para comprobar tal efecto, se piensa que la supresión de la transformación linfocítica puede ser debida a deficiencia de nutrientes en el suero, au-

mento de timidina-P en suero o a la interferencia de la interacción linfocito-mitogéno.

El papel de estos SIF in vivo puede ser de mayor importancia y es el principal responsable de la linfopenia característica de estos pacientes, sin embargo la complejidad de estos factores a dificultado importantemente su estudio.(27,41,42)

MATERIAL Y METODOS

1. Poblaciones. Como grupo testigo se estudiaron 20 sujetos aparentemente sanos, sin antecedentes de ingesta alcohólica y desnutrición, cuyas edades fluctuaron entre los 20 años y 60 años. En cuanto al grupo de pacientes fueron 26 individuos con edades entre los 20 a 60 años, provenientes del Hospital General de México de la SSA, a la selección de pacientes se les hizo una historia clínica, y aplicándoles un cuestionario con preguntas enfocadas principalmente a las características de su ingesta de etanol con la finalidad de determinar el grado de alcoholismo. Además, se tomaron en cuenta las alteraciones hepáticas y renales que permitieron clasificarlos como casos de alcohólicos crónicos activos.

2. Antígenos. Se utilizaron dos antígenos diferentes obtenidos en forma similar, sólo que uno de ellos fue obtenido de hígado cirrótico con CM (comprobado a partir de cortes histológicos) y el otro de hígado normal. El procedimiento de obtención fue el siguiente:

Se tomó una muestra de 35 g de hígado, se maceró y se diluyó 1:3 con medio de aislamiento (sacarosa 0.25M, EDTA 5 U_g y TRIS 5 μ g) pH 7.4. Se pasó a través de un filtro de 8 capas de gasa quirúrgica y se homogenizó. El homogenizado se diluyó 9:1 v/v con medio de aislamiento. Se filtro el homogenizado a través de lana de vidrio y se centrifugó a 2900 rpm por 10 minu-

tos a 4°C. Se resuspendió el sedimento con 10 ml de medio de aislamiento y se homogenizó de nuevo. A 3 ml de la suspensión resultante se le estratificó sobre un gradiente de sacarosa al 60%. Se centrifugó a 23000 rpm por 30 minutos a 4°C y el botón resultante se lavó por 3 veces con solución amortiguadora de fosfato de sodio a pH 7.4 y se centrifugó a 5000 rpm por -- 10 minutos a 4°C.

El sedimento resultante se solubilizó con desoxicolato de sodio al 1%. Se dializó contra una solución de hidróxido de sodio 40 milimolar por cambios de solución frecuentes, para eliminar el detergente de la proteína. Se cuantificaron proteínas por el método de Lowry, ajustando a una concentración de 1 mg/ml de proteína. Se liofilizó y se guardó en refrigeración hasta su uso. Para poder usar el antígeno se esterilizó mediante tindalización.

3. Determinación del factor de inhibición de la migración de leucocitos. (LIF)

Se tomaron 15 ml de sangre venosa heparinizada (0.3 ml de una solución de heparina de 1000 UI/ml) y se dejó sedimentar una hora a 37°C. El plasma sobrenadante rico en células se separó y se transfirió a un tubo estéril, se lavó con medio RMPI centrifugándolo a 1500 rpm durante 5 minutos en frío. Se desechó el sobrenadante, el paquete se resuspendió en 0.4 ml de medio RMPI 1640. Con capilares estériles de 75 mm de longitud y 1.2 de diámetro interno se tomó de la suspensión y se llenaron hasta tres cuartas partes de su capacidad. Un extremo de

cada capilar se selló cuidadosamente a la flama, se dejó enfriar y todos se introdujeron al interior de tubos de ensaye estériles que se centrifugaron a 1000 rpm durante un minuto a 4°C. Se sacaron los capilares que ahora tienen empaquetada la capa blanca en el extremo cerrado del tubo. Se colocaron sobre una superficie plana y cuidadosamente se cortaron a la altura correspondiente al borde superior de la capa blanca. Los capilares cortados se tomaron con pinzas estériles y se depositaron en el fondo de de cámaras de Bloom. Cada horadación se cerró por medio de un cubreobjetos que se fijó con parafina. Una de las cámaras se llenó solamente con 1 ml de medio RMPI 1640, la cual servirá como testigo de la migración libre normal de los leucocitos. La otra cámara se llenó también con medio RMPI 1640 pero adicionado con el antígeno en estudio (de hígado cirrótico y de hígado normal). Las perforaciones laterales de llenado también se sellaron con parafina y las cámaras se incubaron en posición horizontal a 37°C por 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se midieron las áreas de migración. Se usó un amplificador fotográfico que proyecta la imagen sobre una hoja de papel. El área correspondiente se dibujó, se recortó y se pesó.

El área de migración de los testigos se considero como el 100% de migración y ésta se comparó con la obtenida en los problemas. El por ciento de inhibición de la migración se calculó de la manera siguiente:

$$\text{Indice de migración} = \frac{\text{Migración en presencia de antígeno.}}{\text{Migración del testigo (sin antígeno)}}$$

Se tomó como valor mínimo para considerar la prueba positiva a una inhibición de la migración mayor de 20%

4. Análisis estadístico. Con el objeto de obtener elementos de juicio adecuados para discutir los resultados se realizaron dos pruebas estadísticas: la de Mann-Whitney para establecer la existencia o no de diferencias en los grupos estudiados y el análisis de varianza donde se evaluó el efecto relativo de cada una de las variables sobre los resultados totales.

a) Prueba de "U" de Mann-Whitney.

Se trata de una prueba no paramétrica que tiene la ventaja de no hacer suposiciones acerca de la normalidad de la distribución de la población estudiada y no requiere de mediciones muy precisas. En cuanto a su aplicación, se usa para probar si dos grupos independientes corresponden o no a la misma población. Así, si tenemos dos grupos A y B, se propone una hipótesis (H_0) de nulidad (A y B son iguales) o bien una hipótesis (H_1) direccional (A y B son diferentes) y mediante el análisis correspondiente tendría que encontrarse una diferencia mayor a un medio para asegurar que la hipótesis H_1 es la correcta.

b) Análisis de varianza. Permite que la variación total de las observaciones hechas sea dividida en fuentes perfectamente identificadas con el objeto de saber si las diferencias observadas son debidas al error experimental o realmente tienen significado. La hipótesis nula (H_0) supone que los grupos son iguales y la hipótesis alterna (H_1) que son diferentes. Con

los datos obtenidos se determina un valor F ($F_{\text{calculada}}$) que toma en cuenta las medias cuadráticas de los valores obtenidos y del error experimental calculado (que son los estimadores de varianza). Este valor se compara con la F de las tablas para un nivel dado de significancia ($P \leq 0.05$) y si la diferencia es mayor en favor de la F calculada, se acepta la hipótesis H_1 .

R E S U L T A D O S

En el cuadro No. 1 se expresan los datos generales de los pacientes, incluyendo sus alteraciones clínicas, tiempo de dependencia de etanol y lapso de abstinencia antes de haberse tomado la muestra. Destaca que todos los pacientes muestran no sólo importantes alteraciones hepáticas, sino también severas repercusiones en otros órganos, especialmente en riñón. Es necesario hacer notar que en muchos casos hubo también estados de desnutrición asociados.

En el cuadro No. 2 y en la gráfica No. 1 se muestran los resultados de la búsqueda de LIF en pacientes alcohólicos así como en testigos. En los cuadros No.3 y 4 el análisis estadístico correspondiente a esos resultados. Como puede notarse, en el grupo testigo algunos individuos respondieron con la producción de LIF a la presencia de los antígenos probados, sin embargo, el análisis mostró que esos resultados no tienen significado estadístico a excepción de cuando se usó la concentración más baja de antígeno de hígado cirrótico. En los problemas, hubo un mayor número de individuos que respondieron adecuadamente a los antígenos, siendo mejor la respuesta a los antígenos de HC que a los antígenos de HN con una correlación directa a la concentración adecuada.

En el cuadro No. 5 se muestra la comparación de los datos obtenidos entre testigos y pacientes. En el grupo de pacientes alcohólicos hubo una respuesta inmunológica celular significativa con la producción de linfocinas ante la presencia de

antígenos hepáticos, independientes del origen del antígeno. - Con la concentración mayor de antígeno HC hubo una respuesta - mucho mejor que con cualquier otro antígeno, no obstante que - no es despreciable el efecto de otros antígenos. Con respecto al antígeno de hígado normal, el grupo problema respondió de - modo no muy importante cuando se compara con la respuesta a -- los antígenos de hígado cirrótico, pero que resulta digno de - tomarse muy en cuenta al compararse con su efecto en el grupo testigo.

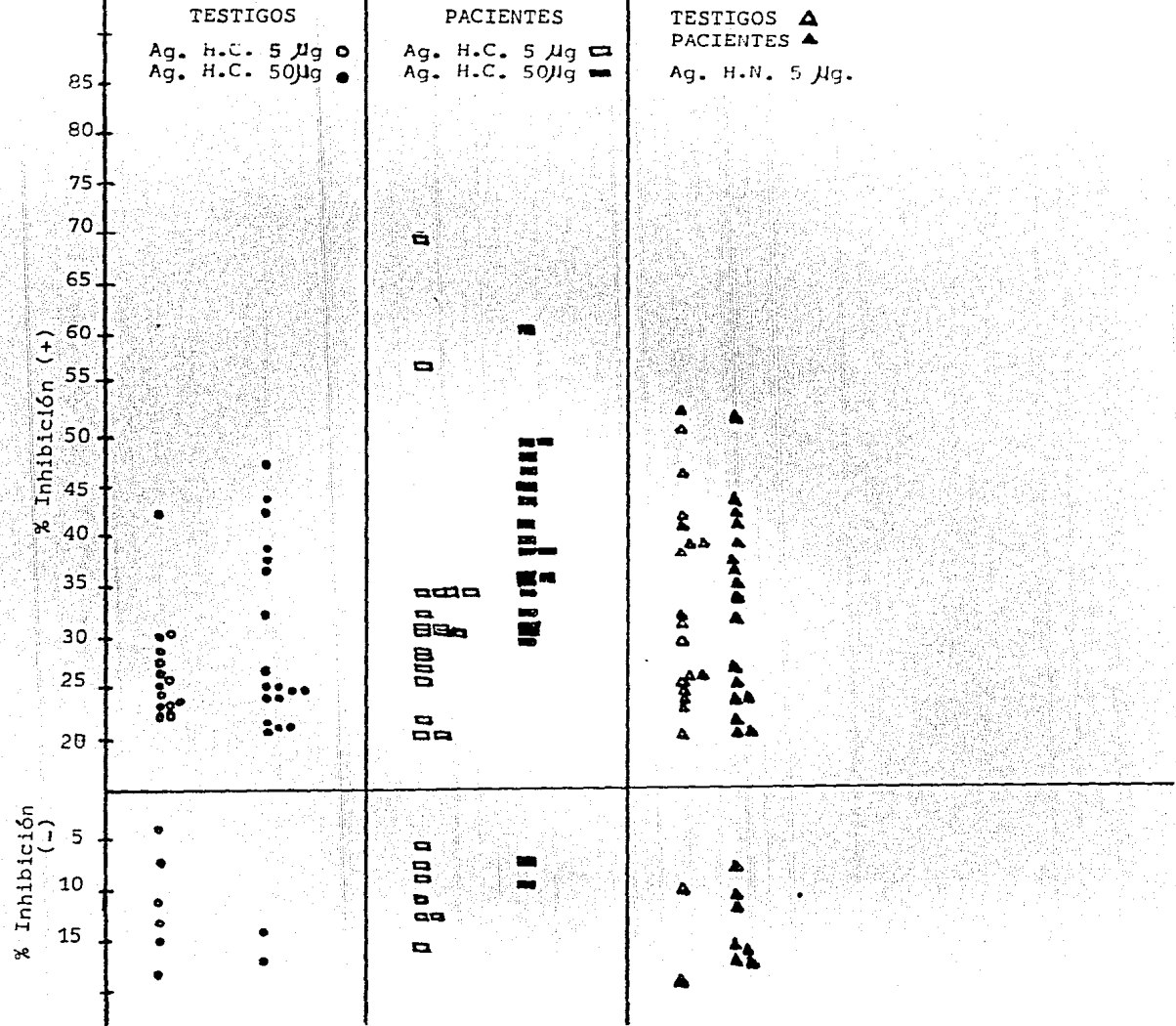
En el cuadro No. 6 se observaron los efectos que cada -- fuente de variación tuvo sobre los resultados obtenidos. Los más importantes fueron la concentración y el tipo de antígeno empleados de modo que 50 μ g/ml de Ag HC son ó están muy cerca de la cantidad óptima para descubrir a los sujetos que tienen linfocitos sensibilizados a ese antígeno. Sin embargo, este método con los antígenos obtenidos en la forma descrita no pa recen tener toda la especificidad adecuada para el grupo problema, ya que hubo respuestas en muchos individuos normales.

CUADRO No. 1 DATOS GENERALES DE LOS PACIENTES.

PAC	EDAD AÑOS	TIEMPO DE DE PENDEN CIA. AÑOS	TIEMPO DE ABSTI- NENCIA AÑOS	ALTERACIONES HEPATICAS	OTROS
PRG	44	10	6meses	Hepatomegalia.	Ascitis. Desnutrición.
OGD	41	12	Ningu- na.	Hepatomegalia. Cirrosis hepática.	Desnutrición.
SLR	27	12	1 sema- na.	Hepatoesteatosis. Insuficiencia -- hepática.	Ascitis. Oliguria.
ALE	36	15	Ningu- na.	Hepatoesteatosis.	Desnutrición III Insuficiencia -- renal.
PRE	44	15	15días	Insuficiencia -- hepática.	Desnutrición.
IGL	44	15	20días	Hepatoesteatosis. Cirrosis hepática.	Desnutrición III Edema escrotal.
FVL	47	23	Ningu- na.	Insuficiencia -- hepática.	Oliguria. Ascitis.
SPA	45	25	Ningu- na	Insuficiencia -- hepática. Cirrosis hepática.	Desnutrición II Infección renal.
RLF	54	27	2meses	Hepatoesteatosis.	Ascitis.
DJG	44	27	3meses	Hepatoesteatosis.	Desnutrición II.
CJL	52	32	Ningu- na.	Insuficiencia -- hepática.	Oliguria. Ascitis.
IOM	49	33	Ningu- na.	Hepatoesteatosis.	Proctorragia. Ascitis.
JMO	40	34	Ningu- na	Hepatomegalia.	Pielonefritis. Ascitis.
GCG	44	34	Ningu- na.	Hepatoesteatosis.	Desnutrición I Neoplasia en mé- dula espinal.

CONTINUACION DEL CUADRO No. 1

PAC	EDAD AÑOS	TIEMPO DE DEPENDENCIA. AÑOS.	TIEMPO DE ABSTINENCIA AÑOS	ALTERACIONES HEPATICAS	OTROS
LMT	54	34	1semana	Hepatoesteatosis Insuficiencia -- hepática.	Desnutrición Coma metabólico ascitis.
LLT	40	34	Ninguna	Hepatomegalia	Pielonefritis. Ascitis.
FOS	55	35	Ninguna	Insuficiencia hepática.	Desnutrición. Ascitis.
MVL	59	35	Ninguna	Hepatoesteatosis. Insuficiencia -- hepática.	Ascitis. Infección renal. Diabetes II.
FCC	47	37	Ninguna	Infección hepática. Hepatomegalia.	Ascitis. Oliguria.
LJG	53	43	Ninguna	Hepatomegalia. Esteatosis.	Ascitis.
RRC	56	46	Ninguna	Hepatomegalia. Hepatoesteatosis.	Pielonefritis. Ascitis.
EAG	62	50	Ninguna	Insuficiencia - hepática.	Insuficiencia -- renal. Neoplasia cervico uterino.



CUADRO No. 2

TESTIGOS				PACIENTES			
No.	Ag. H. C.		Ag. H.N.	No.	Ag. H. C.		Ag. H.N.
	5 µg	50 µg			5 µg	50 µg	
1	4.4	14.0	0.0	1	0.0	7.7	0.0
2	7.0	17.1	15.6	2	5.7	9.9	0.0
3	11.5	20.6	19.4	3	8.1	25.1	8.1
4	13.4	20.7	23.1	4	9.9	27.2	11.5
5	15.5	20.7	23.9	5	11.5	27.2	12.1
6	18.6	21.1	24.3	6	13.0	28.0	16.1
7	22.0	24.0	25.4	7	13.0	29.6	16.4
8	22.2	24.0	25.8	8	16.0	30.0	17.0
9	23.1	24.3	25.8	9	20.2	31.0	17.4
10	23.1	24.7	29.3	10	22.0	31.8	20.2
11	23.5	24.9	31.6	11	25.8	34.4	20.2
12	24.1	25.0	32.0	12	26.5	35.0	21.4
13	25.1	26.5	38.1	13	27.6	35.7	24.3
14	25.6	32.3	38.7	14	28.3	35.7	24.3
15	26.0	36.6	38.8	15	30.0	38.6	26.5
16	27.1	37.1	41.0	16	30.0	38.6	27.9
17	28.6	38.4	42.0	17	30.0	39.2	31.9
18	30.0	42.0	46.1	18	30.4	41.5	33.9
19	30.2	43.5	50.3	19	30.6	43.8	35.1
20	42.1	47.0	52.0	20	32.6	44.3	36.6
				21	34.2	44.9	37.3
				22	34.4	46.7	39.2
				23	34.4	47.9	41.0
				24	34.4	49.6	42.7
				25	57.4	49.6	43.2
				26	69.6	60.4	52.0

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRODUCCION DEL FACTOR DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN PACIENTES ALCOHOLICOS (PAC) Y EN TESTIGOS (TEST).

NOTA. Ag. H. C. = ANTIGENO DE HIGADO CIRROTICO.

Ag. H. N. = ANTIGENO DE HIGADO NORMAL.

CUADRO No. 3

TESTIGOS		
	Ag.H.C 50	Ag. H.N5
Ag. HC 5	z= 1.4700 P= 0.07 NS	z= 2.540 P= 0.005
Ag. HC 50		z= 1.1200 P= 0.13 NS

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LIF ENTRE LOS TESTIGOS, MEDIANTE EL METODO DE "U" DE MANN-WHITNEY.

CUADRO No. 4

PACIENTES		
	Ag.H.C.50	Ag.HN 5
Ag. HC 5	z= 3.0200 P= 0.0013	z= 4.0600 P= 0.00003
Ag. HC 50		z= 2.8000 P= 0.0026

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LIF ENTRE LOS PACIENTES, MEDIANTE EL METODO DE "U" DE MANN-WHITNEY.

CUADRO No. 5

P A C I E N T E S				
T E S T I G O S	Ag. HC 5	Ag H.C. 5 z= 1.63 P= 0.09 NS	Ag. H.C. 50 z= 7.3000 P= 0.00001	Ag. H.N. 5 z= 3.850 P= 0.0001
	Ag. HC 50	z= 2.250 P= 0.01	z= 1.039 P= 0.15 NS	z= 2.210 P= 0.01
	Ag. HN 5	z= 1.770 P= 0.04	z= 4.540 P= 0.00001	z= 9.280 P= 0.000001

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LIF ENTRE EL GRUPO PROBLEMA CON RESPECTO AL GRUPO TESTIGO, MEDIANTE EL METODO DE "U" DE MANN-WHITNEY.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE -- CUADRADOS MEDIOS	"F" calculada	Signifi- cancia
Pacientes	1	430.3	3.07	No.
Tipo de Antígeno	1	7075.6	50.60	Si
Concentración del Antígeno.	1	11604.2	83.05	Si
Relación pa- ciente-antí- geno.	1	916.8	6.56	Si
Relación pa- ciente-concen- tración de an- tígeno.	1	141.3	1.01	No
Relación tipo de antígeno- concentración de antígeno.	1	4247.7	30.40	Si
Error	15	139.7		
Total		45712.6		

CUADRO No. 6 COMPARACION ESTADISTICA POR EL METODO "ANALISIS DE VARIANZA" DEL GRUPO PROBLEMA CON EL GRUPO - PARA CONOCER EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS.

NOTA: El valor de "F" teorica para cada una de las fuentes de variación es $F=3.86$.

D I S C U S I O N

Los mecanismos patógenicos de la cirrosis alcohólica han sido tema de gran investigación debido a que su comprensión podría permitir que se establezcan mejores estrategias para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados globales en este trabajo confirman que en los pacientes hay muchos linfocitos T capaces de producir linfocinas al ser estimulados in vitro con antígenos presentes en hígado dañado. La falta relativa de esta situación en el grupo testigo apunta -- hacia una participación autoinmune en la patogenia de la enfermedad. La respuesta a antígeno de hígado normal no debe llamar la atención ya que es bien conocido que una vez que se ha establecido una respuesta a antígenos propios modificados, se van rompiendo los mecanismos de regulación que mantienen la tolerancia y aparecen paulativamente niveles detectables de elementos inmunológicos con especificidad para antígenos normales, como es el caso de lupus eritematoso diseminado.

Al comparar los resultados obtenidos por la prueba estadística ("U" de Mann-Whitney) observamos que existe una diferencia significativa en la producción de LIF en respuesta a la presencia del antígeno de hígado cirrótico y ante un antígeno de hígado normal. Todo esto coincide con lo reportado por -- otros autores que obtuvieron resultados semejantes.(11,16,22, 31) Sin embargo, existen otros datos en la literatura que indican resultados opuestos a los nuestros.(11,16) Lo anterior parece indicar que existe una sensibilización al antígeno de --

hígado cirrótico que conduce a que los alcohólicos muestren -- una mayor respuesta a la producción de LIF. Esto no lo podemos tomar como algo definitivo ya que no se tomaron en cuenta algunos factores que podrían influir en nuestros resultados. La diversidad de los resultados obtenidos por diferentes investigadores se debe principalmente a una serie de factores de origen diverso, entre los cuales podemos citar: procedimientos para el aislamiento del antígeno, la purificación del antígeno, la solubilización del antígeno y el uso de capilares para probar la inhibición. Como menciona Gluud y autores(16) muchos investigadores utilizan diferentes técnicas para la obtención y por lo tanto hay diferente grado de pureza que impide comparar resultados.(11,22,31) Así como también mencionan que el solvente utilizado resulta tóxico para los linfocitos, lo cual influye en la producción de LIF.(16,31)

Con lo que respecta a nuestro trabajo creemos que los factores que afectaron nuestros resultados y que influyen sobremedida en estos fueron la obtención del antígeno, maniobra que es demasiado laboriosa y que requiere de material muy complejo, por lo que de los varios métodos que existen para su obtención se eligió aquel que se adaptó a las condiciones existentes en el laboratorio mas que por ser el mejor. Por otra parte, quizá el mayor problema que se tuvo fue la pureza del antígeno y aunque ningún investigador trabajo con el antígeno completamente puro, (11,22,31) en nuestro trabajo resultó aún más crudo. Cabe mencionar además, la poca sensibilidad del método utiliza

do para evaluar la respuesta inmune celular ya que no se contó el número de células expuestas a los antígenos utilizados que pudieran haber variado de caso en caso. Además debieron de -- utilizarse otras técnicas para evaluar dicha respuesta, cuyos resultados sumados a los obtenidos con la producción de LIF, -- permitieran una mejor evaluación del estado inmunológico específico de los casos.

Aunado a lo anterior, y hasta donde tenemos conocimiento, ningún investigador ha tomado en cuenta la heterogeneidad de -- la población alcohólica. En nuestro caso la mayoría de la población estudiada tenía diferentes grados de desnutrición, alte raciones de diferente magnitud en varios órganos, diferentes ti pos y volúmenes de bebida empleada, tabaquismo, tiempo variable de dependencia alcohólica, algunos con tratamiento con sicotr^ó picos y en especial un desconocimiento sobre el estado de inmu nocompetencia real del paciente en el momento de la toma de -- muestra. Estas variables son muy difíciles de hacer coincidir en varios sujetos para construirlos en un solo grupo, principal mente porque este tipo de pacientes son muy difícil manejo y -- muchas veces la información que proporcionan no es confiable o no es posible obtenerla por encontrarse en un estado de inconciencia. Además, con frecuencia abandonan el hospital en cuan to ceden sus síntomas y no es posible localizarlos de nuevo.

Es necesario hacer notar que toda respuesta in vitro con la producción de LIF y otras linfocinas cesa al suspender la ingesta de alcohol y se presenta una total recuperación histo

lógica del hígado en el paciente. (11,16,22,31) Lo anterior no lo pudimos comprobar debido a que es casi imposible realizar un seguimiento de los pacientes y además que esto requiere de varios años para comprobar la recuperación histológica.

Analizando los resultados del efecto de la concentración (CM de 5 y 50 μ g), sobre el tipo de respuesta observada y aplicando el análisis estadístico respectivo observamos que la concentración del antígeno en los pacientes alcohólicos influye en el tipo de respuesta para la producción de LIF. Hasta donde tenemos conocimiento ningún autor tomó en cuenta este efecto de la concentración antigénica sobre la producción de LIF en casos de alcohólicos.

Por todo lo anteriormente dicho creemos que para evaluar satisfactoriamente la respuesta inmune celular de este tipo de pacientes primero se debe estandarizar la obtención del antígeno de tal manera que su obtención sea en la forma más pura posible, aunque este sería difícil debido a que actualmente no se ha determinado con exactitud la composición de los cuerpos de Mallory. También hay que elegir otro solvente que sea adecuado para dicho antígeno y que no afecte la viabilidad de las células presentes. Por otro lado hay que seleccionar y realizar simultáneamente varias pruebas altamente sensibles para valorar con mayor exactitud la respuesta inmune celular. Por último hay que tomar en cuenta lo mencionado respecto a la necesidad de estudiar a una población alcohólica lo más homogénea posible y obtener así resultados altamente confiables con respecto a las variables que puedan identificarse.

C O N C L U S I O N E S

En los pacientes alcohólicos hay una respuesta inmunológica celular importante hacia los antígenos presentes en hígado cirrótico manifestada por la producción del factor de inhibición de la migración de leucocitos(LIF).

La producción de linfocinas en los pacientes alcohólicos es dependiente de la dosis de antígeno presente.

Los pacientes alcohólicos también responden activamente con la producción de LIF ante antígenos de hígado normal, lo que puede indicar un rompimiento de la tolerancia.

La respuesta parcial observada en los testigos puede interpretarse como resultado de la baja sensibilidad del método, por lo que se recomienda utilizar otros métodos para hacer una evaluación más precisa.

B I B L I O G R A F I A

1. Calderón-Narvaez, G., (1980)
El alcoholismo, problema médico y social.
Gac. Méd. (México) 116:239-252.
2. Neveillan, F.P., (1981)
Sobre el concepto del alcoholismo. Bol. Of. Sanit.
Panam. 91:24-35.
3. Piña-Garza, E., (1983)
Etanol: catabolismo y efectos metabólicos.
Gac. Méd. (México) 119:2-14.
4. Jellinek, E.M., (1960)
The disease concept of alcoholism. New Brunswick Hinnhouse
Press. p.54-61.
5. Cassaret, Doulls., (1980)
Toxicología. 2a. ed. Mac Millan Publishing Co. Inc. New
York. p. 180-185.
6. Harrison, T.R., (1970)
Medicina Interna. 4a. ed. Prensa Médica. México. p.791-799.
7. Archivos de Biología y Medicina Experimentales: (1969)
suplemento No. 3 (Simposium Internacional de Alcohol y --
Alcoholismo).
8. Bernal, S.G., Trujillo, V.V., Escobar, A., Tsutsumi, V.,
(1983)
Alteraciones histológicas hepáticas en el alcohólico.
Gac. Méd. (México) 1:50-55.

9. Seixas, F.A., (1979)
Currents in alcoholism. Grune and Stratton. New York. 1,2
Y 3.
10. Phillips, M.J., (1982)
Mallory bodies and the liver. Lab. Inv. 47:311-313.
11. Zetterman, R.K., Sorrell, F.M., (1981)
Immunologic aspects of alcoholic liver disease.
Gastroenterology. 81:616-624.
12. Leevy, C.M., Popper, H.S., (1976)
Diseases of liver and biliary tract: standarization of ---
nomenclature, diagnostic criteria and diagnostic methodology.
DHEW Publication(NIH). Washington D.C. 6:718-725.
13. Okamura, K., Harwood, R.T., Yokoo. H., (1975)
Isolation and electrophoretic study an Mallory bodies from
the liver of alcoholic cirrhosis. Lab. Inv. 33:193-199.
14. Helman, R.A., Temko, M.H., Nye, S.W., Failon, H.J., (1971)
Alcoholic hepatitis. Natural history and evaluation of --
prednisolona therapy. Ann. Intern. Med. 74:311-318.
15. French, S.W., Ihrig, T.J., Norum, M.L., (1972)
A method of isolation of Mallory bodies in a purified frac-
tion. Lab. Inv. 26:240-244.
16. Glud, C., Hardt, F., Aldershvile, J., Christoffersen, P.,
Lyøn, H., (1981)
Isolation of Mallory bodies and an attempt to demonstrate -
cell mediate immunity to Mallory body isolated in patients
with alcoholic liver disease.
J. Clin. Pathol. 34:1010-1016.
17. Morton, J.A., Fleming, K.A., Trowell, J.M., McGee, J.O., (1981)
Mallory bodies immunohistochemical detection by antisera to
unique non-prekeratin components. Gut. 185-189.
18. Fleming, K.A., Morton. J.A., Barbatis. C., Burns, J., --
Canning, S., McGee, J.O., (1981)
Mallory bodies in alcoholic and non-alcoholic liver disease
contain a cammon antigenic determinant. Gut. 22:341-344.

19. Morton, J.A., Bastin, J., Fleming, K.A., McMichael, A., --
Burns, J., McGee, O.D., (1981)
Mallory bodies in alcoholic liver diseases identification
of cytoplasmic filaments cell. Gut. 22:1-7.
20. Denk, H., Eckersterfer, R., Schmid, E., Kerjaschki, D., (1979)
Formation and evolution of Mallory bodies (alcoholic hyalin)
in murine and human liver revealed by immunofluorescence -
microscopy with antibodies to prekeratin.
Proc Natl Acad Sci USA: 76:4112-4116.
21. Zinneman, H.H., (1975)
Autoimmune phenomena in alcoholic cirrhosis.
Am. J. Dig. Dis. 20:337-345.
22. Zetterman, R. K., M.D., Luisada-Opper, A., Leevy, C.M., (1976)
Alcoholic Hepatitis. Cell-mediated immunological response -
to alcoholic hyalin. Gastroenterology. 70:382-384.
23. Zetterman, R.K., Leevy, C.M., (1975)
Immunologic reactivity and alcoholic liver disease.
Bull N Y Acad Med 51:533-544.
24. Smith, W.I., Whiteside, T., (1980)
Altered immunity in male patients with alcoholic liver --
disease: evidence for defective immune regulation. Alcoholism.
Clin. Exp. Res. 4:199-206.
25. Wahl, S.W., Wahl, L.M., (1978)
Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation
and collagen production. J. Immunol. 121:942-946.

26. Yokoo, H., Minick, O.T., Batti, F., (1972)
Morphologic variants of alcoholic hyalin. Am J. Pathol.
69:25-32.
27. G, P. Young., M, B. Van der Weyden., I, S. Rose., F, J.
Dudley., (1978)
Lymphopenia and lymphocyte transformation in alcoholics.
Experientia. 35:(2) 268-269.
28. Hallengren, B., Forsgren, A., (1976)
Effect of alcohol on chemotaxis adherence and phagocytosis
of human polymorphonuclear leucocytes. Acta Med. Scand. -
204:43-48.
29. Wozniak, K.J., Silverman, E.M., (1979)
Granulocyte adherence in chronic alcoholism.
Am. J. Clin. Pathol. 71:269-272.
30. Reliv, E., Gougeret, M.A., Ha Kim, J., (1977)
Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with ---
alcoholic cirrhosis. Eun J. Clin. Invest. 7:571-577.
31. M, Triggs. Stella., PR, Mills., (1981)
Sensitisation to Mallory bodies(alcoholic hyalin) in --
alcoholic hepatitis. J. Clin. Pathol. 34:21-24.
32. Kanaqasundaram, N., Kakumu, S., Leevy, C.M., (1977)
Alcoholic hyalin antigen(AHAg) and antibody(AHAb) in --
alcoholic hepatitis. Gastroenterology. 73:1368-1373.
33. Iturriaga, H., Pereda, T., Estevez, A., (1977)
Serum immunoglobulin A. changes in alcoholic.
An Clin Res. 9:39-43.

34. Berenyi, R. Magdalena., Straus, B., Cruz, Danilo., (1974)
In vitro and in vivo studies of cellular immunity alcoholic cirrhosis. *Dig. Dis.* 19:(3)199-205.
35. Sherlock, S., (1970)
The immunology of liver disease.
Am. J. Med. 49:693-706.
36. Schei berg, M.A., (1972)
Delayed hipersensitivity in alcoholic cirrhosis.
Am. J. Dig. Dis. 17:760-762.
37. Hsu, C. CS., Leevy, C.M., (1971)
Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis.
Clin. Exp. Immunol. 8:749-760.
38. G.P. Young., F.J. Dudley., M.B. Van der Weyden., (1979)
Supressive effect of alcoholic liver disease sera on --
lymphocyte transformation. *Gut.* 20:833-839.
39. Brattig, N., Berg, P.A., (1976)
Serum inhibitory factors(SIF) in patients with acute and chronic hepatitis and their clinical significance.
Experimental Immunology. 25:40-49.
40. Fox, R.A., Dudley, F.J., Milligan, J., Sherlock, S., (1973)
Lymphocyte transformation in response to phytohaemagglutinin in primary biliary cirrhosis: The search for a plasma inhibitory factor. *Gut.* 14:89-93.
41. Chisari, F.V., Edgington, T.S., (1975)
Lymphocyte E rosette inhibitory factor: a regulatory serum lipoprotein. *Journal of Exp. Medicine.* 142:1092-1107.

42. Wands, J.R., Dienstag, J.L., (1978)

Inhibition of lymphocyte cytotoxicity by serum from patients with alcoholic liver disease: partial characterization of serum inhibitors.

Biol. Med. 5:615-623.