

11261

13  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

GLORIA BERTHA VEGA ROBLEDO

CIRROSIS HEPATICA:

PROLIFERACION CELULAR ALTERADA A MITOGENOS Y SU RELACION

CON EL ZINC PLASMATICO

TESIS

DE MAESTRIA

EN CIENCIAS BIOMEDICAS:

INMUNOLOGIA

MEXICO, 1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	7
TABLA I	10
RESULTADOS	12
TABLA II	14
TABLA III	15
DISCUSION	16
BIBLIOGRAFIA	24

## RESUMEN

Los pacientes con cirrosis hepática por alcohol tienen una predisposición elevada a contraer infecciones, lo que se traduce en alteraciones de la inmunidad. Presentan además, una disminución importante de constituyentes plasmáticos como el zinc, la albúmina y la transferrina, que se encuentran involucrados en la respuesta inmune.

Se estudió la transformación blastoide de linfocitos estimulados in vitro con fitohemaglutinina M y P en pacientes con cirrosis hepática por alcohol y se trató de correlacionar esta respuesta con los constituyentes plasmáticos mencionados. El índice de transformación blastoide fué significativamente menor ( $p < .001$ ) en el grupo de pacientes, en relación con el grupo testigo, pero no se correlacionó directamente con la concentración de zinc, albúmina, transferrina o globulinas circulantes.

El plasma de los pacientes inhibió significativamente la respuesta de las células normales a la estimulación con fitohemaglutinina y concanavalina A; sin embargo, la transformación blastoide de los linfocitos de los pacientes, no se restableció a niveles normales cuando se incubaron con el plasma de los testigos.

## INTRODUCCION.

Los pacientes con cirrosis hepática, presentan niveles bajos de zinc plasmático,<sup>(1-3)</sup> los que no siempre están en relación con la magnitud del daño tisular. En los pacientes con cirrosis por alcohol, esta deficiencia se presenta probablemente como consecuencia de la falta de ingestión o de alteraciones en la absorción de este elemento a nivel intestinal<sup>(4)</sup>. Si el consumo de bebidas alcohólicas persiste, se puede suscitar un aumento en sus requerimientos, debido a que en el metabolismo del alcohol interviene la deshidrogenasa alcohólica, enzima dependiente del zinc. Existe también un descenso de proteínas transportadoras, que como la transferrina y la albúmina<sup>(1)</sup> son sintetizadas en el hígado. En los pacientes con enfermedad hepática descompensada, se observa no sólo una deficiencia cuantitativa de albúmina, sino también una disminución de su afinidad por el zinc<sup>(4)</sup>. Por otra parte, se ha visto que el zinc unido a los aminoácidos se vuelve más dializable, por lo que es factible, que el aumento en su excreción urinaria, se vea favorecido por la aminoaciduria que presentan los pacientes con cirrosis hepática<sup>(3,5,6,7)</sup>; además, en sujetos con un balance negativo de nitrógeno, se ha detectado una correlación entre éste y la excreción urinaria del zinc<sup>(8)</sup>.

La deficiencia de zinc puede manifestarse por infecciones recurrentes, retraso en la cicatrización de las heridas y las

úlceras, así como por piel rugosa o escamosa, alteración en el crecimiento de las uñas y el pelo, infertilidad, cambios neurosensoriales, trastornos mentales, hiposmia, hipogeusia, anemia y visión nocturna disminuida<sup>(4,9-11)</sup>; en los niños predominan la anorexia, el retraso en el crecimiento y el hipogonadismo<sup>(12)</sup>.

En los pacientes con deficiencia de zinc, se han detectado alteraciones inmunológicas principalmente a nivel celular, entre otras, involución prematura del timo, linfocitopenia T, anergia cutánea e inactivación de la timulina (factor tímico sérico); puede existir también un descenso en los niveles de la hormona tímica circulante<sup>(13-14)</sup>, la producción de linfocinas y en la actividad de las células asesinas naturales<sup>(15)</sup>.

El zinc es esencial para un gran número de procesos metabólicos que incluyen etapas en la síntesis de DNA, RNA y de proteínas<sup>(16-17)</sup>. La disminución del metal en el organismo origina la acumulación de nucleótidos, fosfatos, aminoácidos y otros compuestos<sup>(5)</sup>, que afectan de manera importante el compartimento intracelular por la toxicidad que ocasiona tal acúmulo, principalmente el de nucleótidos<sup>(18)</sup>.

El zinc estabiliza la configuración cuaternaria de numerosas proteínas, en algunas de las cuales se han identificado sitios específicos de interacción proteína-metal<sup>(17)</sup>; de esta manera, el

zinc además de intervenir en la función catalítica y reguladora de las enzimas, tiene un importante papel estructural. A nivel celular, el metal está presente en el citoesqueleto y participa en la estabilización de las membranas, lo que puede dar como resultado la inhibición de eventos tan importantes como la desgranulación de la célula cebada y la liberación de serotonina plaquetaria<sup>(19-21)</sup>. Se ha observado que el zinc ejerce cierto efecto protector contra algunas lesiones producidas en la membrana del eritrocito por agentes que, como el virus de la influenza, la estreptolisina O, el complemento y la citolisina T, ocasionan poros sensibles a cationes divalentes. Aunque el zinc no evita la formación de canales, sí desplaza al agente hemolítico de la membrana y logra mantener a los poros con una configuración cerrada<sup>(22)</sup>.

Algunas de las enzimas involucradas en la división celular requieren zinc<sup>(23-25)</sup>. Así se ha observado que, el zinc puede prevenir o revertir la acción inhibitoria que ejerce el ácido etilendiaminotetraacético sobre la síntesis de DNA, o la 1-10 o-fenantrolina sobre la función citotóxica asesina de linfocitos estimulados *in vitro* con fitohemaglutinina (PHA). Es interesante el hecho de que otros metales divalentes como el cobalto y el cobre en el primer caso<sup>(26)</sup>, o el calcio y el magnesio en el segundo<sup>(15)</sup>, no presentan un efecto similar al del zinc.

En cultivos de células, la síntesis de DNA se lleva a cabo de

una manera óptima cuando el medio se suplementa con suero humano normal<sup>(27-28)</sup>. De los componentes del suero, la albúmina tiene la capacidad de promover la división celular, pero se ignora si existe algún factor fisiológicamente unido a ella, que contribuya o sea responsable de este estímulo<sup>(29-30)</sup>. En el medio de cultivo, la sustitución del suero humano normal por el complejo zinc-transferrina, también produce una estimulación de la división celular, que es discretamente menor (25%) a la propiciada por el suero<sup>(27)</sup>. Por otra parte, varios autores han observado la participación del zinc en el crecimiento del timo en ratones<sup>(31)</sup>, así como su efecto mitogénico sobre linfocitos<sup>(24,32-38)</sup>.

Los pacientes con cirrosis hepática por alcohol, tienen una susceptibilidad a contraer infecciones, lo que indica la existencia de alteraciones en su inmunidad. En los pacientes descompensados, se ha observado una alteración en las pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía y una disminución de los linfocitos T totales<sup>(39-40)</sup>. En este punto no existe un acuerdo en la relación de linfocitos T estimuladores/supresores, pues mientras algunos autores la han encontrado sin alteraciones<sup>(39-40)</sup>, otros han detectado una disminución en la actividad de las células T supresoras<sup>(41-42)</sup>.

Los estudios de proliferación celular en linfocitos de pacientes con cirrosis hepática, también han mostrado



discrepancias<sup>(43-51)</sup>. Entre los autores que la encontraron disminuida, algunos observaron además que el suero de estos pacientes, inhibe el crecimiento de los linfocitos normales estimulados in vitro con PHA<sup>(44-47)</sup>; algunas investigaciones encaminadas a relacionar diversas variables de disfunción hepática con este fenómeno de inhibición, mostraron una correlación negativa entre la respuesta al estímulo mitogénico inducido con PHA y la cantidad de gamma globulinas<sup>(44)</sup>, bilirrubinas y aspartato amino transferasa (TGO) circulante<sup>(45)</sup>, en tanto que otras no lograron encontrar una correlación entre la respuesta linfocitaria al mitógeno y bilirrubinas, TGO o fosfatasa alcalina circulantes<sup>(47)</sup>. Sin embargo, queda aún por dilucidar la participación de muchas variables, entre las que se encuentra el zinc, que de manera tan importante y contradictoria<sup>(52-56)</sup> participa en la respuesta inmune y cuya disminución unida a la de albúmina y transferrina circulantes, contribuye a la alteración de la membrana del linfocito. Esto induce a suponer que la depresión en la respuesta al estímulo mitogénico, esté asociada con la deficiencia de constituyentes plasmáticos esenciales.

Con base en lo anterior y con el propósito de encontrar una alteración susceptible de modificarse, que permita mejorar el estado clínico del paciente, se investigó la relación existente entre la concentración de zinc, transferrina, albúmina y otros constituyentes plasmáticos y la síntesis de DNA inducida por

autógenos, en linfocitos de pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

## MATERIAL Y METODOS

### Pacientes

Se estudiaron 25 pacientes hospitalizados, adultos, 17 (68%) del sexo masculino y 8 (32%) del femenino, cuyas edades fluctuaron entre los 35 y los 60 años ( $\bar{X}=48$ ), con diagnóstico clínico y de laboratorio de cirrosis hepática por alcohol, basado en los antecedentes de ingestión crónica de bebidas alcohólicas y en los datos de insuficiencia hepática e hipertensión portal (ictericia, hepatomegalia, telangiectasias). La mayoría de los pacientes presentaron trastornos de la coagulación que contraindicaron la punción hepática, por lo que sólo en un tercio de los casos, el diagnóstico se confirmó por biopsia. Se excluyeron de éste grupo en estudio, los pacientes que habían recibido transfusiones sanguíneas o terapia inmunodepresora; con endocrinopatía, infección, leucopenia severa, así como los que habían ingerido bebidas alcohólicas en los últimos cuatro días. El grupo testigo estuvo formado por 35 individuos adultos, clínicamente sanos, 20 del sexo masculino y 15 del femenino, de 25 a 45 años de edad ( $\bar{X}=39$ ).

## Plasma

De cada individuo mantenido en ayuno durante 12 horas, se obtuvieron 10 ml de sangre venosa en jeringa de plástico estéril y heparinizada (50 UI/ml). La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 500 g y el plasma se separó en condiciones de esterilidad. Una parte se utilizó de inmediato en las pruebas de estimulación mitogénica y el resto se congeló para ser usado posteriormente en las determinaciones de zinc, albúmina y transferrina.

## Determinación de zinc, albúmina y transferrina en plasma

El zinc se determinó según el método de Davies<sup>(50)</sup>, que consiste esencialmente en desproteinizar al plasma con ácido tricloroacético al 25%, seguido de centrifugación; en el sobrenadante libre de partículas se cuantificó el zinc por absorción atómica en un espectrofotómetro (Unicam S.P. 90). La concentración de proteínas totales se evaluó por el método de Lowry y col.<sup>(60)</sup> y la albúmina, así como el resto de las fracciones protéicas, por electroforesis en un densitómetro microzonal Beckman modelo R-110<sup>(61)</sup>. La concentración de transferrina se obtuvo por inmunodifusión radial<sup>(62)</sup>.

## Cultivo de linfocitos

Los linfocitos se obtuvieron de acuerdo con la técnica de Boyum<sup>(6)</sup> y se procesaron en condiciones de esterilidad, ajustandolos a  $5 \times 10^5$  células/ml de medio de cultivo Mc Coy 5a (Gibco, Grand Island, N.Y.) y el plasma en estudio a una concentración del 10%. El cultivo no contenía suero fetal. Los linfocitos de los pacientes y los testigos se estimularon con PHA-M (40  $\mu$ g/cultivo; Difco, Detroit, Mich.) o con PHA-P (10  $\mu$ g/cultivo; Difco) desde el inicio del cultivo y de acuerdo con la Tabla I. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Los linfocitos se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> (5%); 24 horas antes de la cosecha se agregó a cada cultivo 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-TdR, New England Nuclear Inc., Boston MA.). Al finalizar el tiempo de incubación, las células se lavaron con solución salina y timidina (50  $\mu$ g/ml), se precipitaron con ácido tricloroacético frío al 6% y se centrifugaron nuevamente a 500 g; el precipitado se disolvió en 2 ml de líquido de centelleo. La incorporación de <sup>3</sup>H-TdR se determinó en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb). El índice de incorporación de <sup>3</sup>H-TdR se obtuvo por la diferencia de cuentas por minuto (cpm) existente entre los cultivos estimulados con el mitógeno y los no estimulados. Los resultados se expresaron como el promedio de cpm  $\pm$  el error estandar.

TABLA I

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPATICA AL ESTIMULO MITOGENICO<sup>a</sup>

Grupo	Linfocito	Plasma	PHA-M <sup>b</sup>	PHA-P <sup>c</sup>	Con A <sup>d</sup>
1	paciente	paciente	+	+	NSH <sup>e</sup>
2	paciente	testigo	+	+	NSH
3	testigo	testigo	+	+	NSH
4	testigo	paciente	+	+	+
5	paciente	paciente <sup>f</sup>	-	-	-
6	testigo	testigo <sup>f</sup>	-	-	-

- a. El cultivo de los linfocitos y su estimulación mitogénica se realizaron como se describe en Material y Métodos.
- b. PHA-M: grupos 1-6, n=20.
- c. PHA-P: grupos 1-3, n=5; grupos 3-6, n=15.
- d. Con A: grupos 3-6, n=10.
- e. NSH. no se hizo.
- f. Cultivos control sin mitógeno.

Con el objeto de determinar si el efecto inhibitor del plasma de los pacientes preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un año, persistía, se cultivaron linfocitos provenientes de 10 sujetos normales con el plasma de 10 pacientes cirróticos, a una concentración final de 10%. Se incluyó un grupo control con el mismo número de células a la usada en los problemas. El estímulo mitogénico se indujo con 10  $\mu\text{g}$  de PHA-P y 5  $\mu\text{g}$  de Concanavalina A (Con A, Sigma, St. Louis MO.). Los cultivos se hicieron por triplicado y se procesaron como se describió previamente.

#### Citotoxicidad plasmática

Se probó también el efecto citotóxico del plasma de los pacientes sobre los linfocitos normales. Con tal objeto se realizaron estudios de viabilidad celular en los cultivos anteriormente descritos, la cual se determinó a los 60 minutos y a las 72 horas de incubación. Los cultivos control tenían el mismo número de células normales ( $5 \times 10^5$ ) y plasma autólogo (10%). La viabilidad se determinó por la exclusión del azul tripano<sup>(64)</sup>.

#### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Mann-Whitney<sup>(65)</sup> y los coeficientes de correlación de Spearman y Kendall<sup>(66-67)</sup>.

## Resultados

Los pacientes con cirrosis hepática presentaron niveles plasmáticos de zinc, albúmina y transferrina significativamente menores ( $p < .01$ ) que los observados en los individuos normales (Tabla II). Asimismo, los niveles de proteínas totales se encontraron disminuidos significativamente ( $p < .001$ ) en los pacientes; por otra parte, las globulinas variaron, observándose que las  $\alpha$ -2 estaban significativamente disminuidas ( $p < .001$ ), mientras que las  $\alpha$ -1,  $\beta$  y  $\gamma$  mostraron aumentos, los que a excepción de las  $\beta$ , fueron significativos ( $p < .01$ ) en relación con los valores de los sujetos normales (Tabla II).

Cuando los linfocitos de los pacientes cirróticos se estimularon con mitógenos, se observó en 24 de los 25 individuos estudiados, una respuesta disminuida en comparación a la observada en sujetos sanos, (Tabla III, grupos 1 y 3); esta diferencia fue significativa ( $p < .001$ ). Al incubar los linfocitos de los pacientes con el plasma normal, se apreció una ligera recuperación en 11 (45%) de los 24 pacientes afectados, pero sólo en 3 (12%) alcanzó valores similares a los del testigo (Tabla III, grupos 2 y 3). Por otra parte, los linfocitos de los individuos normales ( $n=35$ ) que se incubaron con el plasma de los pacientes, mostraron en 29 (82%) de 35 casos, una respuesta significativamente inferior al ser estimulados con FHA-M ( $p < .01$ ), PHA-P ( $p < .01$ ) y Con A ( $p < .01$ ), en

relación a la obtenida con el plasma autólogo normal (Tabla III, grupos 3 y 4).

Al examinar los resultados individualmente, no se encontró una correlación directa entre la respuesta celular al estímulo mitogenico y la disminución en la concentración plasmática de zinc, albumina y transferrina, así como con la de proteínas totales y globulinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En todos los casos el valor de  $r$  fué menor de 0.34.

El plasma de los pacientes no mostró efecto citotóxico sobre los linfocitos de los sujetos normales (testigos). La viabilidad celular determinada por la exclusión del azul tripano, fué similar a la que se obtuvo con el plasma de los individuos normales. La viabilidad a los 60 minutos de incubación, fué de 95% y a las 72 horas fué de 90%.



TABLA II

VALORES PLASMATICOS DE ZINC, ALBUMINA, TRANSFERRINA, PROTEINAS  
 TOTALES Y GLOBULINAS EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPATICA Y EN  
 SUJETOS NORMALES

DETERMINACION de:	PLASMA		p
	pacientes	testigos	
Zinc ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	50 $\pm$ 3.3	86 $\pm$ 4.5	< .01
Albumina ( $\text{g}/\text{dl}$ )	2.3 $\pm$ 0.11	4.1 $\pm$ 0.08	< .01
Transferrina ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	189 $\pm$ 27.2	286 $\pm$ 11.1	< .01
Proteinas totales ( $\text{g}/\text{dl}$ )	6.7 $\pm$ 0.24	7.5 $\pm$ 0.08	< .01
Globulinas: $\alpha$ -1 ( $\text{g}/\text{dl}$ )	0.27 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	< .001
$\alpha$ -2	0.50 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.02	< .001
$\beta$	1.34 $\pm$ 0.12	1.10 $\pm$ 0.05	NS
$\gamma$	2.25 $\pm$ 0.18	1.46 $\pm$ 0.06	< .01

Valor promedio de 20 muestras  $\pm$  error estándar.

TABLA III

ESTIMULACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPATICA CON MITOGENOS Y EFECTO DEL PLASMA DE ESTOS PACIENTES SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE SUJETOS NORMALES

Grupo	CULTIVO		MITOGENOS <sup>a</sup>			
	Linfocitos	Plasma	PHA-M <sup>b</sup>	PHA-P <sup>c</sup>	PHA-P <sup>d</sup>	Con A <sup>d</sup>
1	paciente	paciente	12808±1946	25748±12941		
2	paciente	testigo	16420±1811	29834±15125		
3	testigo	testigo	26620±3348	90208±23317	128447±23653	82188±15796
4	testigo	paciente	18046±3060	50440±21569	70483±25097	50188±22763

a. Valores de p: grupo 1 vs 2, NS; grupo 3 vs 2, <0.02; grupo 3 vs 4, <0.01; grupo 1 vs 3, <0.001.

b. Promedio de 20 muestras ± error estándar.

c. Promedio de 6 muestras ± error estándar.

d. Promedio de 10 muestras ± error estándar.

## DISCUSION

Los resultados de este estudio indican que los linfocitos de los pacientes con cirrosis hepática por alcohol, presentan una alteración en su capacidad para responder a los mitógenos. Esta incapacidad se manifiesta por una disminución en la división celular, determinada por la incorporación de  $^3\text{H-TdR}$ . Asimismo, el plasma de los pacientes mostró un efecto inhibitor sobre la síntesis de DNA, en los linfocitos de sujetos normales estimulados con varios mitógenos; ambas observaciones coinciden con lo reportado por otros autores<sup>(44-47)</sup>. Es interesante mencionar que este efecto, se observó también en el plasma de los pacientes almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un año.

La alteración que presentan los linfocitos de los pacientes no es reversible en la mayoría de los casos, pues cuando las células se incubaron con plasma normal, no obstante el haber mejorado ligeramente en 11 de los 24 sujetos afectados, sólo en tres alcanzó valores normales, similares a los del testigo (Tabla III). Lo anterior difiere de lo reportado por Dowd y Hsu<sup>(39,47)</sup>, quienes observaron una respuesta normal a PHA cuando las células de los pacientes se incubaron con plasma normal.

Dado que en los pacientes con cirrosis hepática por alcohol, existe una disminución significativa en las concentraciones

plasmáticas de zinc, albumina y transferrina, exploramos la posibilidad de que alguno de estos componentes pudiera explicar la alteración en la respuesta de los linfocitos a los mitógenos; desafortunadamente, no hubo una relación directa entre la concentración de estas variables y el índice de estimulación mitogénica en cada individuo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Duchateau<sup>(68)</sup> en sujetos normales con suplemento de zinc y por Wade<sup>(69)</sup> en ratas desnutridas, quienes tampoco encontraron una correlación entre la concentración sérica de zinc y algunos indicadores de inmunidad celular. Sin embargo, Cavdar<sup>(52,70)</sup> observó en pacientes con enfermedad de Hodgkin, una relación directa entre el índice de estimulación mitogénica y los valores de zinc sérico.

Es posible que los niveles circulantes del zinc no reflejen la cantidad "activa" del metal, ya que en los pacientes con daño hepático disminuye la concentración plasmática de albúmina, que constituye uno de los transportadores más eficaces del zinc. Otro acarreador que también disminuye en la circulación de estos pacientes y que es especialmente importante para el sistema de los linfocitos T, es la transferrina<sup>(55,71)</sup>; proteína a la que el metal se une en menor cantidad, pero de manera más constante que a la albumina y para la cual se han encontrado receptores de alta afinidad en los linfocitos<sup>(55,72)</sup>. Así el zinc, probablemente circula unido a proteínas como la IgG y la  $\alpha$ -2 macroglobulina, que

Se encuentran en mayor cantidad en los pacientes con cirrosis hepática y que por la firmeza o irreversibilidad de su unión, impiden la actuación del metal<sup>(73-75)</sup>.

Dowd<sup>(93)</sup> estudió pacientes desnutridos por distintas causas, entre otros con cirrosis hepática y encontró una relación directa entre la disminución en la proliferación de linfocitos estimulados por Con A y la concentración de transferrina en suero autólogo, lo que no se observó al cultivar los linfocitos de los pacientes con suero normal (CAB), donde la respuesta celular se normalizó y no se relacionó con la concentración de transferrina.

Existen otros factores circulantes capaces de deprimir la transformación blastoide de los linfocitos, entre ellos una molécula no incluida en nuestro estudio, la  $\alpha$ -feto proteína; sin embargo la cantidad circulante de esta proteína en la cirrosis hepática sin hepatoma, no parece ser suficiente para deprimir la transformación blastoide<sup>(76-77)</sup>. Por otra parte, el efecto inhibitor de este factor se pierde en cuando el linfocito se coloca en un medio normal, lo que no sucedió en este estudio.

Lo anterior sugiere dos cosas: la primera, que en los pacientes con cirrosis hepática por alcohol pueden existir alteraciones celulares que no revierten con facilidad. A este respecto, se ha señalado en ellos una disminución notable de los

receptores de membrana agonistas de adenosina<sup>(78)</sup>, con el subsecuente descenso en los niveles de AMPc y el acúmulo del potencialmente citotóxico GTP. Cuando el GTP aumenta sostenidamente, disminuye la proliferación de los linfocitos, lo que puede resultar de una inhibición sobre la ribonucleótido reductasa y la S adenosil homocisteína hidrolasa<sup>(58,79)</sup>. Este fenómeno se acentúa al disminuir el zinc, elemento que además de utilizar a los metabolitos en la síntesis de proteínas y/o ácidos nucleicos, tiene la capacidad de estimular a los receptores mencionados. La disminución de los receptores de adenosina solo se observó en pacientes con cirrosis hepática por alcohol y no en enfermedad hepática de otra etiología<sup>(78)</sup>, lo que puede explicar parcialmente las diferencias observadas en estos pacientes. Por otra parte, secundaria a la deficiencia del zinc intracelular y del complejo zinc-timosina circulante, puede verse afectada la maduración de la célula T y la generación de linfocinas<sup>(80-81)</sup>, reduciéndose de manera importante la cantidad de IL-2 y su número de receptores. Se ha sugerido que la IL-2 estimula la proliferación de las células T activadas, al inducir la expresión de un número óptimo de receptores para transferrina, la que a su vez canaliza zinc y hierro al interior de la célula.

La segunda observación que surge de estos resultados, es que en el plasma de estos pacientes hay uno o varios factores inhibidores, no citotóxicos, entre los que se encuentran moléculas

pertenecientes al grupo de las  $\alpha$ -globulinas. Los hepatocitos incrementan la secreción de las globulinas durante las respuestas de fase aguda y éstas, mediante su acumulo en los sitios de inflamación, intervienen en la restitución del balance homeostático después de la lesión tisular y la infección. Al disminuir el zinc, aumenta el efecto supresor de algunas de ellas sobre los linfocitos<sup>(01-02)</sup>; inhiben así, la secreción de ciertas citocinas entre las que se encuentra el factor de necrosis tumoral (TNF), que actúa como pirógeno endógeno y es capaz de producir lesiones tisulares.

En los pacientes cirróticos aumentó significativamente la fracción  $\alpha$ -1 de las globulinas, que incluye lipo y glicoproteínas; de estas últimas, la ácida se reconoce como potente inmunosupresor, sin embargo, no encontramos una correlación entre la concentración de la fracción  $\alpha$ -1 y la transformación blastoide de los linfocitos. Por el contrario, los pacientes presentaron un descenso significativo de la fracción  $\alpha$ -2 que comprende entre otras a la protrombina, ceruloplasmina y macroglobulina; el aumento de esta última se encuentra posiblemente enmascarado en la concentración final de la fracción  $\alpha$ -2 circulante, por la disminución tan importante de los otros integrantes; tampoco se correlacionó con la replicación de los linfocitos. La fracción  $\beta$  aumentó, probablemente a expensas de las lipoproteínas, ya que el metabolismo de las grasas puede verse afectado cuando hay deficiencia de proteínas transportadoras y zinc; la marcada disminución de la transferrina

que también integra este grupo, pudo influir en el resultado final del aumento de la fracción  $\beta$ , que no fue significativo en relación con el grupo testigo. Asimismo, se observó en estos pacientes el aumento tan reconocido de las gamma globulinas, al que se ha dado como posible explicación la existencia de un estímulo antigénico sostenido. Este mecanismo se vería propiciado, por la incapacidad del hepatocito lesionado para manejar a los antígenos provenientes de la flora bacteriana intestinal y por la recurrencia de infecciones que presentan estos pacientes. No encontramos una correlación entre la concentración de estas globulinas y la respuesta de los linfocitos al estímulo mitogénico, lo que difiere de lo reportado por algunos autores<sup>(44)</sup>.

Otro posible inhibidor es el cortisol, que aumenta en la circulación de los pacientes cirróticos; sin embargo, su efecto depresor sobre las células T se lleva a cabo a niveles muy elevados y principalmente en roedores<sup>(45)</sup>. En éstos se ha implicado, que el aumento de la hormona es secundario a la hipertrofia suprarrenal ocasionada por la deficiencia del zinc. No obstante, sería útil determinar la relación del cortisol con el metal y su efecto real en los pacientes con cirrosis hepática.

La influencia tan importante que ejercen el zinc, la albúmina y la transferrina sobre la inmunidad en estos pacientes, amerita estudios más profundos, pues su concentración plasmática no siempre



refleja la que interactúa a nivel celular, ni la porción activa circulante. A lo anterior hay que agregar la influencia de inhibidores en la circulación, la alteración de los receptores de membrana, la variación de nucleótidos y la disponibilidad real del zinc. Todo esto puede ayudarnos a entender la variabilidad que se presenta en los estudios de inmunidad y zinc<sup>(52-58,84)</sup>, en los pacientes con cirrosis hepática y en aquellos individuos con patología similar pero de diferente etiología.

## BIBLIOGRAFIA

1. Boyett, J., Sullivan, J. Distribution of protein-bound zinc in normal and cirrhotic serum. *Metabolism*. 19: 148, 1970.
2. Schechter, P., Giroux, J., Schlienger, J., Hoenig, S., Sjoerdsma, A. Distribution of serum zinc between albumin and alfa 2-macroglobulin in patients with decompensated hepatic cirrhosis. *Europ. J. Clin. Invest.* 6: 147, 1976.
3. Sullivan, J., Parker, M., Boyett, J. Incidence of low serum zinc in noncirrhotic patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 591, 1969.
4. Mc Clain, C., Chu, Su. L. Zinc deficiency in the alcoholic: A review. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 7: 5, 1983.
5. Goodhart, S. Trace Elements. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lea and Febiger. Ceds. J., Philadelphia, p. 382, 1977.
6. Boyett, J., Sullivan, J. Abnormalities of zinc-binding protein in the serum of cirrhotics. *J. Lab. Clin. Med.* 71: 857, 1968.

7. Díez-Ruiz, A., Gil Extremera, B., Gutiérrez Gea, G., Muñoz Ruiz, C. Serum Ig and T cell subpopulations in alcoholic cirrhosis after oral zinc therapy (letter). *Gastroenterol. Clin. Biol.* 12: 584, 1988.
8. Bunker, V., Hinks, L., Stansfield, M., Lawson, M., Clayton, B. Metabolic balance studies for zinc and copper in housebound elderly people and the relationship between zinc balance and leukocyte zinc concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 353, 1987.
9. Halsted, J., Smith, J. Plasma-zinc in health and disease. *Lancet* I: 322, 1970.
10. Jackson, M., Jones, D., Edwards, R. Tissue zinc levels as an index of body zinc status. *Clin. Physiol.* 2: 333, 1982.
11. Burch, R., Sullivan, J. Clinical and nutritional aspects of zinc deficiency and excess. *Med. Clin. North. Am.* 60: 675, 1976.
12. Prasad, A. Zinc deficiency in man. *Am. J. Dis. Child.* 130: 259, 1976.

13. Prasad, A., Meftah, S., Abdallah, J., Kaplan, J., Brewer, G., Bach, J., Dardenne, M. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J. Clin. Invest.* 82: 1202, 1988.
14. Dardenne, M., Pleau, J., Lefrancier, P., Bach, J. Role of zinc and other metals in the biological activity of the serum thymic factor. *Seances Acad. Sci.* 292: 793, 1981.
15. Allen, J., Perri, R., Mc Clain, C., Kay, N. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 102: 577, 1983.
16. Gaskin, F. *In vitro* microtubule assembly regulation by divalent cations and nucleotides. *Biochem.* 20: 1318, 1981.
17. Serrano, L., Dominguez, E., Avila, J. Identification of zinc binding sites of proteins: zinc binds to the amino-terminal region of tubulin. *Anal. Biochem.* 172: 210, 1988.
18. Meftah, S., Prasad, A. Nucleotides in lymphocytes of human subjects with zinc deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 114: 114, 1989.
19. Chvapil, M. Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med. Clin. North Amer.* 60: 799, 1976.

20. Cunnane, S. Role of zinc in lipid and fatty acid metabolism and in membranes. *Progr. Food Nutr. Sci.* 12: 151, 1988.
21. Pasternak, C. A novel role of  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ : Protection of cells against membrane damage. *Biosci. Rep.* 8: 579, 1988.
22. Mahadevan, D., Ndirika, A., Vincent, J., Bashford, L., Chambers, T., Pasternak, Ch. Protection against membrane mediated cytotoxicity by calcium and zinc. *Am. J. Pathol.* 136: 513, 1990.
23. Rühl, H., Kirchner, H., Bochart, G. Kinetics of the zinc stimulation of human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1089, 1971.
24. Pilz, R., Willis, R., Wanlass, S., Seegmiller, J. Regulation of human lymphoblast ecto-5'-nucleotidase by zinc. *Adv. Exp. Med. Biol.* 165 B: 147, 1984.
25. Reardon, Ch., Lucas, D. Heavy-metal mitogenesis:  $Zn^{++}$  and  $Hg^{++}$  induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunobiol.* 175: 455, 1987.
26. Williams, R., Loeb, L. Zinc requirement for DNA replication in stimulated human lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 58: 594, 1973.

27. Phillips, J., Azari, P. Zinc-transferrin. *Cell Immunol.* 10: 31, 1974.
28. Torney, D., Imrie, R., Mueller, G. Identification of transferrin as a lymphocyte growth promoter in human serum. *Exp. Cell. Res.* 74: 163, 1972.
29. Spieker-Polet, J., Polet, H. Identification of albumin as the serum factor essential for the growth of activated human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 251: 987, 1976.
30. Arai, S., Yamana, I., Tanno, T., Takishima, R. Role of bovine serum albumin in blastoid transformation of lymphocytes by phytohemagglutinin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154: 444, 1977.
31. Fraker, P., DePasquale-Jardieu, P., Swickl, C., Luecke, F. Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5660, 1978.
32. Krishna, M., Schewartz, S., Good, R. Age-dependent effects of zinc on the transformation response of human lymphocytes to mitogens. *Cell. Immunol.* 42: 270, 1979.
33. Dowd, P., Kelleher, J., Walker, B., Guillou, P. Nutrition and cellular immunity in hospital patients. *Br. J. Nutr.* 55: 515, 1986.

34. Csermely, P., Szamei, M., Resch, K., Sogyi, J. Zinc increases the affinity of phorbol ester receptor in T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 578, 1988.
35. Cunningham-Rundles, S., Cunningham-Rundles, B., Good, R., Zinc induced activation of human B lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16: 115, 1980.
36. Warner, G., Lawrence, D. Stimulation of murine lymphocyte responses by cations. *Cell Immunol* 101: 425, 1986.
37. Kirchner, H., Salas, M. Stimulation of lymphocytes with zinc ions. *Methods. Enzymol.* 150: 112, 1987.
38. Berger, N., Skinner, A. Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions. *J. Cell. Biol.* 61: 45, 1974.
39. Jovanovic, R., Lymphocyte subpopulations in patients with alcoholic liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 31: 125, 1986.
40. Rodríguez Felix, L., Martín Santana, J., Gutiérrez Fernández, J., Zamora-Madaria, E. Alteraciones de la inmunidad celular y estado de nutrición en la cirrosis hepática etílica. *Rev. Clin. Esp.* 180 (9): 496-501, 1987.

41. Tomino, S., Fujiwara, H., Kagimoto, T., Mitanya, H., Nishimura, H., Kishimoto, S. Decreased suppressor T cell activity in patients with hepatic cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 48: 625, 1982.
42. Spinozzi, F., Rambotti, P., Gerli, R., Cernetti, C., Rondoni, F., Frascarelli, A., Bertotto, A., Grignani, F. Immunoregulatory T cells in alcoholic liver disease: phenotypical dissection of circulating leu 3/T4 inducer T-lymphocytes. J. Clin. Lab. Immunol. 23: 161, 1987.
43. Thestrup-Pedersen, K., Ladefoged, J., Andersen, P. Lymphocyte transformation test with liver specific protein and phytohemagglutinin in patients with liver disease. Clin. Exp. Immunol. 24: 1, 1976.
44. Newberry, J., Shorey, J., Sanford, J., Combes, B. Depression of lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver disease. Cell. Immunol. 6: 87, 1973.
45. Young, G., Dudley, F., Van der Wayden. Suppressive effect of alcoholic liver disease sera on lymphocyte transformation. Gut. 20: 833-839, 1979.



46. Tong, M., Kenneth, M., Teifer, R., Quismorio, F. Immunological studies in familial primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol.* 71: 305, 1976.
47. Hsu, C., Leevy, C. Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 749, 1971.
48. Zetterman, R., Sorrelli, M. Immunological aspects of alcoholic liver disease. *Gastroenterol.* 81: 816, 1981.
49. Schlienger, J., Willemin, B., Lang, North, M., Simon, G., Doffoel, M., Bockel, E. Evaluation of malnutrition and immunity in alcoholic liver diseases. *Presse Med.* 15: 1023, 1986.
50. Mills, P., Shenkin, A., Anthony, R., Mc Lelland, A., Main, A., Mac Sween, R., Russell, R. Assessment of nutritional status and in vivo immune responses in alcoholic liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 849, 1983.
51. Mutchnick, M., Lee, H. Impaired lymphocyte proliferative response to mitogens in alcoholic patients. Absence of a relation to liver disease activity. *Alcoholism: Exp. Res.* 12: 155, 1988.

52. Cavdar, I. Zinc status and cellular immunity in pediatric Hodgking's disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 129: 207, 1983.
53. Zanzonico, P., Fernandes, G., Good, R. The differential sensitivity of T-cell and B-cell mitogenesis to *in vitro* zinc deficiency. *Cell. Immunol.* 60: 203, 1981.
54. Kramer, T. Reevaluation of zinc deficiency of concanavalin A induced rat spleen lymphocyte proliferation. *J. Nutr.* 114: 953, 1984.
55. Blazsek, I., Mathe, G. Zinc and immunity. *Biomed. Pharmacother.* 30: 187, 1984.
56. Fraker, P., Jardieu, P., Cook, J. Zinc deficiency and immune function. *Arch. Dermatol.* 123: 1899, 1987.
57. Fraker, P., Gershwin, M., Good, R., Prasad, A. Interrelationships between zinc and immune function. *Fed. Proc.* 45: 1474, 1986.
58. Cossack, Z. T lymphocyte dysfunction in the elderly associated with zinc deficiency and subnormal nucleoside phosphorylase activity: effect of zinc supplementation. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25: 973, 1989.

59. Davies, I., Musa, M., Dormandy, T. Measurements of plasma zinc in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 21: 359, 1968.
60. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
61. Polson, A., Rusell, B. A densitometric method for determining the position of optimum proportions in the double-diffusion apparatus. En *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Williams, C. and Chase, M. (eds.). Academic Press, Inc. New York, p. 186, 1971.
62. Mancini, G., Vaerman, J., Carbonara, A., Hermans, J. Immunochemical cuantification of antigens by single radial immunodifusion. *Immunochem.* 2: 235, 1965.
63. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 77, 1967.
64. Philips, H. Dye exclusion tests for viability. En *Tissue Culture Methods and Applications*. Krause and M. Patterson (eds.). Academic press. New York, p. 405, 1973.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

65. Mann, H., Whitney, D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 16: 50, 1947.
66. Kendall, M. Rank and product moment correlation. *Biometrika* 35: 177, 1949.
67. Siegel, S. *Estadística no paramétrica*. Trillas. (Ed.), México, p.143, 1975.
68. Duchateau, J., Delespesse, G., Vereecke, P. Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 88, 1981.
69. Wade, S., Lemonnier, D. Early nutritional experiments: effects on the humoral and cellular immune response in mice. *J. Nutr.* 113: 1131, 1983.
70. Cavdar, A., Babacan, E., Gozdasoglu, S., Ertan, J., Cin, S., Arcasoy, A., Ertem, U. Zinc and anergy in pediatric Hodgkin's disease in Turkey. *Cancer* 59: 305, 1987.
71. Evans, G. Transferrin function in zinc absorption and transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 775, 1975.

73. Phillips, J. Specific binding of zinc transferrin to human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 634, 1976.
73. Adham, N., Song, M., Fundercknecht, H. Binding of zinc to alpha-2-macroglobulin and its role in enzyme binding activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 495: 212, 1977.
74. Foster, D., Aamodt, R., Henkin, R., Berman, M. Zinc metabolism in humans: a kinetic model. *Am. J. Physiol.* 237: 340, 1979.
75. Gettins, P., Cunningham, L. A unique pair of zinc binding sites in the human  $\alpha_2$ -macroglobulin tetramer. A  $^{35}\text{Cl}$  and  $^{37}\text{Cl}$  NMR study. *Biochem.* 25: 5004, 1986.
76. Yachnin, S., Lester, E. Inhibition of human lymphocyte transformation by human alpha-fetoprotein (HAFF); comparison of foetal and hepatoma HAFF and kinetic studies of in vitro immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 26: 484, 1976.
77. Yachnin, S. Demonstration of the inhibitory effect of human  $\alpha$ -feto protein on in vitro transformation of human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 2857, 1976.

78. Diamond, J., Wrubel, B., Estrin, W., Gordon, A. Basal and adenosine receptor-stimulated levels of cAMP are reduced in lymphocytes from alcoholic patients. *Med. Sci.* 84: 14, 1987.
79. Strauss, P., Henderson, F., Goodman, M. Nucleosides and lymphocytes -An overview. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179: 413, 1985.
80. Dowd, P., Kelleher, J., Guillou, P. T-lymphocyte subsets and interleukin-2 production in zinc deficient rats. *Br. J. Nutr.* 55: 59, 1985.
81. Scuderi, P. Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cell. Immunol.* 126: 391, 1990.
82. Scuderi, P., Dorr, R., Liddil, J., Finley, P., Meltzer, P., Raitano, A., Rybski, J. Alpha-globulins suppress human leukocyte tumor necrosis factor secretion. *Eur. J. Immunol.* 19: 939, 1989.
83. De Pasquale-Jardieu, P., Fraker, P. The role of corticosterone in the loss in immune function in the zinc-deficient A/J mouse. *J. Nutr.* 109: 1847, 1979.
84. Fosmire, G. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 225, 1990.