

11281 6
23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA. ESTUDIOS DE POSTGRADO

Y

UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH

AT GALVESTON, TEXAS

EFFECTO DEL ETANOL SOBRE LA RESPUESTA

INMUNE T-INDEPENDIENTE

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ESPECIALIDAD INMUNOLOGIA

TUTOR NACIONAL: DR. JESUS KUMATE

TUTOR EN E.U.A.: DR. THOMAS JERRELLS

DRA. ARACELY PALAFOX ZALDIVAR

1993

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

HOJA

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	11
HIPOTESIS.....	12
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	43

RESUMEN

Recientemente se ha determinado que aproximadamente de 25 a 40% de los pacientes que ingresan a los hospitales generales lo hacen por complicaciones causadas por abuso del alcohol: una de éstas complicaciones, que con mayor frecuencia se encuentra, es la susceptibilidad aumentada a los agentes infecciosos (1-3). El deterioro que el etanol genera sobre la respuesta inmune es el responsable del aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas y neoplásicas que se observa en los pacientes alcohólicos (4). Los efectos del etanol en la respuesta inmune se han estudiado tanto en humanos como en animales de experimentación; esos estudios han demostrado que algunos parámetros inmunológicos inespecíficos tales como la función de los fagocitos, de las células asesinas naturales y el movimiento ciliar se encuentran afectadas (5-13).

De particular interés son los hallazgos que establecen que el etanol tiene un efecto más amplio sobre algunos parámetros inmunológicos específicos tales como: pérdida de células linfoides del timo, bazo y sangre periférica en animales de experimentación y cambios en la composición celular de la sangre periférica en los humanos (14-16). Los cambios funcionales en las células linfoides son: disminución de la respuesta proliferativa a mitógenos que estimulan tanto linfocitos derivados del timo (17-19), como células productoras de anticuerpos (20), alteración de los mecanismos de la respuesta humoral, incluyendo la producción de anticuerpos (21) y defectos en la respuesta inmune celular, tales como reacciones de hipersensibilidad retardada (22-23).

Sin embargo no ha sido determinado si estas alteraciones en la respuesta inmune son debidas al efecto del alcohol per se o a otras complicaciones asociadas frecuentemente con el alcoholismo tales como deficiencias nutricionales, disfunción hepática, etc. Existen escasos estudios realizados en modelos animales, los cuales no reflejan adecuadamente algunas de las condiciones presentes en el alcoholismo humano, tales como la vía de administración; además, las consecuencias del efecto del EtOH en el sistema inmune incluyendo la respuesta a agentes infecciosos, enfermedades autoinmunes y la respuesta inmune contra las neoplasias no han sido estudiadas en detalle usando modelos ya establecidos; por otra parte, existen resultados contradictorios en relación a los mecanismos de inmunosupresión debido al alcohol (22-23).

Para obtener resultados que nos ayudaran a entender el efecto del alcohol sobre el sistema inmune, utilizamos un modelo experimental bien caracterizado en ratones machos de la cepa C57BL/6 alimentados con dieta líquida con 37% de alcohol desarrollado por Lieber-DeCarli (24), lo que nos permitió evaluar críticamente los efectos del alcohol en la respuesta primaria de células B a antígenos T independientes (TI), estimulando con fosforilcolina (PC), determinante antigénico unido a la pared celular de Streptococcus pneumoniae R36A (25-27).

Estos resultados nos permitirán entender el efecto del alcohol en el funcionamiento del sistema inmune y mejorar el manejo clínico de los pacientes alcohólicos, así como conocer las alteraciones específicas del sistema inmune producidas por el etanol, lo que nos dará conocimientos adicionales relacionados con el mismo.

INTRODUCCION

CELULAS B.

En el ratón, las células que eventualmente se determinarían como células B, se encuentran ontogénicamente, en la placenta; sin embargo, estas mismas células aparecen en el hígado al inicio del segundo trimestre del desarrollo intrauterino y durante la primera semana de vida neonatal, las células B también se desarrollan en el bazo y poco tiempo después del nacimiento, la médula ósea toma la primicia como fuente principal en la producción de nuevas generaciones de células B y continúan con este papel durante el resto de la vida. (28-30). Las células B alcanzan su madurez en estos tres sitios, y es concebible que cada una de estas fases del desarrollo de lugar a diferentes subpoblaciones (28-30).

La diferenciación progresiva de las células B a lo largo de su desarrollo se divide en dos etapas: la primera, antígeno independiente y la segunda antígeno dependiente (28)

La primera se identifica después de que las células madre han iniciado su diferenciación hacia células B; en esta etapa se les denomina células pre B o fase antígeno independiente, al parecer su desarrollo está bajo la influencia del medio ambiente que las rodea (30); las células que se encuentran en este estadio se distinguen por antígenos específicos en su superficie y por la síntesis de cadenas pesadas, las cuales se pueden detectar en su citoplasma. Posteriormente, adquieren la capacidad de producir cadenas ligeras, en esta etapa las células B son pequeñas e inmaduras, y expresan IgM en su superficie (31); en estadios subsecuentes, las células B presentan una gran variedad de receptores para mitógenos, tales como determinantes antígenicos la e IgM en su superficie; sin embargo, durante esta etapa las células pre B de la médula ósea pueden expresar moléculas en la superficie celular que no son expresadas por las células pre B del hígado fetal (32-33). La expresión de inmunoglobulinas de superficie es una característica común a todas las células B que permite la selección clonal por el antígeno; las células B al parecer totalmente maduras, dejan la médula ósea sin divisiones posteriores (34-35).

Poco después de que las células B son formadas, entran a la circulación y migran a diversas áreas de residencia tales como el bazo, los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides secundarios (36).

Experimentos recientes indican que en esta fase antígeno-independiente, las células más maduras, las que presentan inmunoglobulinas en su superficie, son más susceptibles a inactivación por antígenos polivalentes, anticuerpos anti-inmunoglobulinas, anticuerpos anti-isótopos, a inductores específicos tales como inmunoglobulinas y por antígenos con altas densidades de determinantes antígenicos (37-40). La exposición a estas

moléculas produce un déficit permanente de células B o pérdida de células B funcionales.

La segunda fase antígeno dependiente, se determina por la interacción de las células B con un antígeno que se une a la inmunoglobulina (Ig), expresada en la superficie celular, característica de las células ya maduras de respuesta primaria, lo que permite una serie de eventos que culminan con la producción de células plasmáticas que producen anticuerpos específicos contra el antígeno inductor; estos eventos son:

- 1) Activación de fase G₀ a fase G₁ del ciclo celular (40).
- 2) Proliferación: En condiciones de cultivo in vitro, las células pueden dividirse de 4 a 8 veces; las condiciones de expansión clonal in vivo, están poco entendidas (41-43). Las células en esta fase son relativamente insensibles a la inducción de tolerancia, lo cual incrementa su habilidad para acumular señales de estimulación por antígenos y factores no específicos producidos por células T (factores B) que dan estímulos para la proliferación celular, y para la diferenciación hasta células plasmáticas (40-43).
- 3) Cambios de isotipo, el cual conlleva el movimiento de los genes de las regiones VDJ ya ensamblados, a una región cercana al gen de una nueva cadena pesada y la consecuente eliminación de los genes de las cadenas pesadas intercaladas entre estas 2 regiones (44-46).
- 4) Diferenciación terminal a células plasmáticas, que se acompaña de la detención en la división celular (41,42,47).
- 5) Generación de células B de memoria: Algunas de las células hijas generadas durante la fase proliferativa, en donde se incluyen las etapas previas y posteriores al cambio de isotipo, parecen entrar en un largo estado de reposo, resultando en un número cada vez mayor de células que puedan responder a retos secundarios con el antígeno inductor; además, las células B de respuesta secundaria difieren de las células producidas en la respuesta primaria en varios aspectos, incluyendo la intensidad en la estimulación antigénica. De manera similar, las células B de respuesta secundaria podría ser producto de una línea celular originada de progenitores diferentes a las células B de respuesta primaria, o podría representar otro estado de maduración de células B estimuladas durante la respuesta primaria (38,40,42).

El desarrollo de cada uno de estos cinco estadios o fases de la maduración de las células B, pone de manifiesto la existencia de múltiples líneas de células B, tanto en términos de expresión de marcadores de superficie, como capacidad funcional. Es más difícil determinar si estas diferencias identifican varias líneas celulares dentro de la misma línea, ya que se ha determinado que las células B de una sola línea celular se pueden

comportar de una manera diferente dependiendo del estadio de maduración clonal (29,48,49).

Con toda esta información sobre las diferentes capacidades funcionales de las subpoblaciones de las células B, es posible sugerir, que no solo existen diferentes subpoblaciones, sino que son capaces de responder en contra de antígenos T independientes (TI), así como contra antígenos T dependientes (TD). Se ha demostrado que células B relativamente inmaduras son capaces de responder a antígenos TI-1 de la misma manera que responden a antígenos TD, y que en etapas más avanzadas de maduración responden a antígenos TI-2 (37,50,53).

Quizá el sistema de maduración de las células B más extensamente estudiado es el de los ratones de la cepa CBA/N, los cuales presentan un defecto ligado al cromosoma X, en la expresión de las moléculas de superficie de las células B (48-52).

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que la cepa CBA/N presenta estos defectos en la expresión de marcadores de membrana de las células B del bazo, debido a la virtual ausencia de IgM+, Ia+, IgD+ y CR+, población madura de células B (52). Esta conclusión se ha derivado del hecho de que las células B de esta cepa responden debilmente a antígenos TI-2 y expresan en su superficie patrones de inmunoglobulinas de superficie con concentraciones altas de IgM y bajas de IgD y antígenos específicos de células B correspondientes a etapas iniciales del desarrollo de estas células en ratones neonatos de cepas convencionales (53). Este déficit celular de la cepa CBA/N puede ser explicado igualmente por la ausencia de poblaciones de células B maduras que predominan en animales convencionales, concluyendo así que si las líneas celulares que dominan en ratones neonatos son diferentes a las que dominan en ratones maduros, entonces las células B de los ratones CBA/N pueden simplemente representar el ciclo completo de maduración de tipo neonatal (50-52-54).

Esto indicaría como los diversos estadios del desarrollo de las células B pueden jugar un papel de importancia funcional del sistema.

RESPUESTA T INDEPENDIENTE

Muchos de los factores que pueden influenciar la activación de la diferenciación de una célula B al actuar con un antígeno específico han sido identificados; uno de estos factores es la heterogeneidad dentro de la población de células B (55).

Las células B son heterogéneas, en cuanto a su diferenciación o estado de maduración, fase del ciclo celular, tamaño o densidad celular, línea celular en particular a la que pertenezca o a las distintas subpoblaciones que responden a estímulos T independientes o T dependientes (55).

Durante la respuesta inmune humoral dependiente de células T cooperadoras (T_H), los linfocitos B en reposo requieren cuando menos de tres señales de activación distintas para poder producir clonas de células secretoras de anticuerpos que responden a antígenos TD (53,55,56). La primera señal se genera después de la administración del antígeno y su captura por células del sistema macrofágico-monoclear. Estas células (T_H) endocitan, digieren y presentan en su superficie el antígeno o fragmentos al antígeno a células que reconocen tanto al antígeno como a sus fragmentos, en colaboración con antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), expresados en la superficie de las células denominadas células procesadoras del antígeno, células presentadoras o células accesorias (células A).

La segunda señal es la activación de linfocitos B antígeno específicos en estado de reposo, lo que los hace más susceptibles a la acción de linfocinas que inducen la proliferación celular.

La tercera señal, es el control del ciclo celular de los linfocitos B activados por linfocinas, antígenos o interacciones célula-célula (54-55).

Se sabe que los múltiples controles del ciclo de las células B indican que la cooperación de células (T_H), células A y células B es necesaria para que las células B respondan a la mayoría de los antígenos, además es evidente que estas interacciones son gobernadas por proteínas de la membrana codificadas por el sistema MHC, particularmente las moléculas de clase II (antígenos Ia).

La influencia de las células A en la respuesta de las células B puede ser reemplazada por factores solubles secretados por las células A activadas. Melchers y Anderson (41, 42) denominaron a estos activadores factores alfa. Estudios recientes en cultivos de blastos inducidos por la activación de moléculas policlonales y sin la presencia de células A, demuestran que los factores alfa controlan la entrada de estas células a la fase S del ciclo celular, cuatro a seis horas después del inicio de la mitosis dentro del ciclo celular de 20 hrs. (41-42).

Por otra parte se ha demostrado que muchas de las líneas celulares pertenecientes a la clase de células accesorias, células T o células B producen factores solubles con actividad semejante a los factores alfa; se ha informado también que algunos de los factores de crecimiento de las células B pertenecen al grupo de estos mismos factores (41-42 58).

Los requerimientos de las diferentes señales de activación en la generación de células formadoras de placa (PFC) por células B seleccionadas (Igs en su superficie) han sido analizadas en cultivos de baja densidad celular para minimizar los posibles efectos de la contaminación con células T (56,57,59); usando este sistema, se ha demostrado que no solamente en la respuesta T dependiente, sino también en la respuesta T independiente, las células B en reposo reciben también tres señales diferentes:

- 1) Señal de las células T cooperadoras en colaboración con el complejo mayor de histocompatibilidad. señal que puede ser suprimida por activadores policlonales tales como lipopolisacárido (LPS).
- 2) Señal dada por el antígeno.
- 3). Señal dada por las células T cooperadoras mediada por MHC y por factores inespecíficos que inducen la activación de células B y que no pueden ser reemplazadas por activadores policlonales (60-62).

Los antígenos TI capaces de activar a las células B han sido clasificados en antígenos TI-1 y TI-2, en base a su capacidad de inducir una respuesta inmune con la producción de anticuerpos específicos en ratones adultos normales y ratones lactantes o de la cepa CBA/N afectados por el síndrome de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X (xid) (63-64).

Se ha demostrado que antígenos TI-1, tales como LPS o *Brucella abortus* (BA), tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune con la producción de anticuerpos en estos tres diferentes grupos de ratones, ya que pueden substituir o suprimir los efectos producidos por las células T y aparentemente no necesitan la acción inductora de factores beta que estimulan la proliferación de células B (61,62,64).

Los antígenos TI-2, de los cuales el AECM-ficol o el dextran son tomados como prototipos, en contraste con los antígenos TI-1, no son activadores policlonales, pues se ha demostrado que solo estimulan efectivamente a ratones adultos normales (52-53); es decir, los antígenos TI-2 son capaces de estimular solamente células maduras, las cuales están ausentes en ratones neonatos normales y en ratones CBA/N, deficientes en la maduración de células B (65-66).

En nuestro modelo experimental se induce la respuesta de células B a fosforicolina (PC), determinante antigénico común en helmintos, hongos y bacterias tales como *Streptococcus pneumoniae* R36A . antígeno T independiente de la clase 2, el cual no es dependiente de la presencia de macrófagos o de células T cooperadoras, por lo que la respuesta primaria de células de bazo en animales de experimentación refleja únicamente el funcionamiento de las células B (67-68).

Las células B en fase G₀ del ciclo celular, son refractarias a la acción de los factores inductores de la proliferación celular. Estas células tienen que estimularse durante el estado de reposo para que sean susceptibles a la acción de factores inductores de la proliferación. Es necesario determinar si los receptores para estos factores se expresan solamente en la superficie de las células B, después de que éstas son activadas, si estos receptores están siempre presentes, o si se encuentran solamente después de la activación celular y se ligan funcionalmente a las reacciones que inducen el inicio del ciclo celular (37-38).

Se ha demostrado también, que la respuesta de las células B a los antígenos TI-2 requieren factores solubles liberados por la interacción de clones de células T y células accesorias, sin embargo, no se ha podido distinguir entre los factores producidos por las células T (factores beta) y los producidos por las células accesorias (factores alfa) (37-39). Sin embargo, se ha probado que algunas acciones inducidas por antígenos TI, reemplazan la acción de los factores de crecimiento de las células B en el ciclo celular, entre ellas la acción de los factores beta (62-64). Una segunda función de los activadores de las células T reemplazada por antígenos TI, se hace evidente en estados de estimulación; ya que se ha determinado que la formación de puentes entre inmunoglobulinas expresadas en la superficie de células B es obligatoria para su estimulación.

Estos puentes se forman por la repetición de determinantes antigénicos en forma regular en los antígenos TI. Es probable que la formación de estos puentes juegue un papel determinante en los procesos de activación de la fase G1 del ciclo celular.

Se han observado numerosos cambios en los parámetros bioquímicos de las células B tempranamente después de que han sido estimuladas por activadores policlonales como LPS o por anticuerpos específicos. Estos cambios incluyen: aumento en el tamaño de las células B y en la captura de Ca^{++} , despolarización de la superficie celular, cambios en el metabolismo del fosfatidilinositol, aumentó en la expresión de marcadores de superficie tales como Ia, e incremento de RNA (37-39). Muchos de estos cambios ocurren rápidamente y aparentemente sincronizados; por contraste, la entrada al ciclo mitogénico es asincrónico y ocurre a velocidad constante después de la activación de la fase G1 en las primeras 24 hrs. (37,39,61).

La unión de los antígenos TI con determinantes únicos solamente puede inducir la formación de puentes entre las inmunoglobulinas presentes en la superficie de las células B cuando una célula T reconoce determinantes del acarreador en función de los antígenos MHC clase II (37).

Se puede inducir la formación de puentes entre las inmunoglobulinas de superficie mediante interacciones múltiples con un gran número de receptores de células T los antígenos TI-1 y 2 pueden producir esa formación sin la ayuda de los receptores de la membrana celular de los linfocitos T (50-55).

EFFECTOS DEL ETOH EN LOS SISTEMAS INMUNOLOGICO Y HEMATOPOYETICO.

Desde el punto de vista clínico, claramente se han documentado los efectos nocivos para la salud asociados al alcoholismo: los eventos metabólicos resultantes del abuso del alcohol son variados y complejos; entre ellos los más visibles son: daño hepático, pancreatitis, alteraciones del sistema nervioso central, aumento en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, defectos al nacimiento y mayor susceptibilidad a agentes infecciosos: algunas investigaciones en desarrollo apoyan la teoría de que la predisposición de los alcohólicos a las infecciones son el resultado de alteraciones de los mecanismos de defensa del hospedero (1-5).

Se ha demostrado que algunos parámetros inmunológicos no específicos se encuentran deprimidos, tales como la quimiotaxis y la fagocitosis por macrófagos y granulocitos (6-7). Se ha sugerido que otros mecanismos tales como el movimiento de los cilios en el aparato gastrointestinal o en el aparato respiratorio también se encuentran afectados por el alcohol (69). Además se ha informado que aunque la acción fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones tratados con alcohol y cultivados in vitro se encuentra suprimida, con y sin estimulación, la producción de materiales tóxicos no se encuentra alterada (6-7-16). Por otra parte otros autores han demostrado un aumento en la actividad no específica de células asesinas naturales (9-10).

De estas observaciones se puede concluir que a pesar de que concentraciones elevadas de alcohol se asocian a inmunosupresión ésta no afecta a todos los parámetros inmunológicos.

De particular interés son los estudios que han establecido que el EtOH tiene un efecto mayor sobre la respuesta inmune específica. Estudios en pacientes alcohólicos han demostrado alteraciones en el desarrollo y la expresión de la respuesta inmune mediada por células, asociadas con hipersensibilidad retardada a antígenos solubles, disminución en el número de células linfocitarias, atrofia tímica, cambios en la población de los linfocitos en la circulación y supresión de la transformación blastoide mediada por la respuesta proliferativa de los linfocitos a la concanavalina A, y al LPS y disminución en la respuesta proliferativa a células alógenas en respuesta linfocitaria mixta (14,18, 22,68).

Otros estudios han demostrado que para compensar las alteraciones que induce el EtOH a la respuesta inmune hay un efecto compensador en otros componentes de esta respuesta; en estudios *in vitro*, se ha encontrado aumento de la producción de algunas linfocinas así como un aumento en la producción espontánea de la citotoxicidad mediada por células (18-19).

Las alteraciones funcionales de los linfocitos no solo son evidentes en su capacidad de proliferar *in vitro*, sino que también se extiende a su inhabilidad de inducir una respuesta inmune a retos con antígenos T dependientes. Los resultados de estudios previos en nuestro laboratorio (69), demuestran que el EtOH dado al mismo tiempo o inmediatamente después de la inmunización se observa una disminución en la respuesta a antígenos T dependientes (14-19), también, al igual que otros investigadores, hemos visto que el EtOH induce una pérdida marginal de las células productoras de anticuerpos que se desarrollan durante la respuesta a antígenos TI.

En la producción de anticuerpos contra los antígenos TD interviene la interacción de diferentes poblaciones de linfocitos, incluyendo células presentadoras de antígeno, células T cooperadoras, y células B. La incapacidad de responder a antígenos TD puede ser el resultado del mal funcionamiento en uno o más de estos tipos de células. Debido a que para la producción de anticuerpos a antígenos TD se necesita de células T funcionales, es posible que la inhabilidad de producir una respuesta adecuada sea debida a la pérdida de células T (62,64,70,72). También se ha demostrado que el EtOH afecta a los macrófagos, lo que puede influir en la habilidad para producir una respuesta inmune; como puede verse, a pesar de los numerosos estudios existentes, aun no se ha demostrado en donde radica el efecto específico del EtOH sobre el sistema inmune; éste puede presentarse a cualquier nivel, desde el reconocimiento del antígeno a nivel de macrófagos y la producción de linfocinas hasta otros niveles en la actividad de las células T o B.

Estudios preliminares en nuestro laboratorio y en otros laboratorios utilizando la técnica de hemólisis de placa, han demostrado que el EtOH solamente induce una pérdida marginal de células productoras de anticuerpos que desarrollan una respuesta a antígenos T independientes (TI).

Se ha publicado un gran número de trabajos contradictorios en relación al efecto inmunosupresor del EtOH; estos estudios se han desarrollado en diferentes modelos animales, dosis de EtOH, vía de administración, deficiencias nutricionales y mal funcionamiento hepático, lo que hace imposible compararlos.

Finalmente el modelo ideal del alcoholismo propuesto por Lieber-DeCarli (24) tiene importantes ventajas: 1) El EtOH es administrado por vía oral, por lo que la ingestión y probablemente el metabolismo siguen rutas semejantes a lo normal, 2) Se utilizaron ratones alimentados con el mismo tipo de dieta líquida, lo que reduce el efecto que las diferencias en ingesta calórica parecieran tener y 3) Los animales expuestos, se encuentran bien nutridos y aunque desarrollan esteatosis hepática, no llegan a desarrollar cirrosis, ésto solo produce alteraciones mínimas en el funcionamiento hepático, lo que permite estudiar sin variables asociadas, diversos aspectos de la inmunocompetencia, tales como número de células en el bazo y en el timo, respuestas linfoproliferativas de células del bazo a mitógenos específicos para células T y B y capacidad funcional de las células B medida por la producción de anticuerpos específicos desarrollados en contra de antígenos T independientes (TI).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Medir parámetros de la respuesta inmune en ratones que ingieren alcohol en su dieta.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Medir la respuesta proliferativa de los linfocitos del bazo a mitógenos específicos de células T (concanavalina A) y de células B (lipopolisacárido).
- 2) Medir la respuesta proliferativa de los linfocitos de timo a mitógenos específicos de células T (concanavalina A) y de células B (Lipopolisacárido).
- 3) Medir la formación de colonias de células B mediante activación con Lipopolisacárido.
- 4) Medir la producción de anticuerpos específicos producidos contra antígenos T independientes de la clase 2 mediante la técnica de células formadoras de placa.
- 5) Medir la producción de anticuerpos específicos contra antígenos T independientes de la clase 2 mediante la técnica de clonación de células B.

HIPOTESIS

Algunos parametros de la respuesta inmune se encuentran alterados en ratones que ingieren alcohol en su dieta.

MATERIALES Y METODOS

El presente es un estudio prolectivo, experimental en ratones machos de la cepa C57BL/6; el universo estuvo constituido por 24 animales divididos en cuatro grupos de la siguiente manera:

- Grupo I: Estuvo compuesto por 6 ratones de 20 a 25 gr. de peso alimentados con dieta líquida con alcohol y de los que se obtuvieron células del bazo y del timo para determinar la respuesta proliferativa a los mitógenos concanavalina A y lipopolisacárido bacteriano de E coli, respuesta linfocitaria mixta usando células alogénicas y clonación de linfocitos B.
- Grupo II: Estuvo también compuesto por 6 ratones machos de 20 a 25 gr. de peso que recibieron dieta líquida sin alcohol practicándoseles las mismas pruebas, sirviendo como testigos del grupo anterior.
- Grupo III: Constituido por 6 ratones con las mismas características de los grupos anteriores alimentados con dieta líquida/alcohol, los que fueron inmunizados intraperitonealmente con fosforilcolina practicándoseles la respuesta proliferativa a mitógenos y aloantígenos, clonación de células B y respuesta primaria específica mediante la producción de anticuerpos determinada por hemólisis de placa e inmunotransferencia.
- Grupo IV: Constituido por 6 ratones con las mismas características de los grupos anteriores, los cuales fueron alimentados con dieta líquida, control, inmunizados intraperitonealmente con fosforilcolina, sirviendo como testigo del grupo anterior mediante la determinación de los mismos parámetros inmunológicos.

Este estudio se realizó en 2 fases: la primera con los 4 grupos después de 7 días de iniciado el tratamiento con dieta líquida y la segunda con 4 grupos después de 14 días de iniciado el tratamiento.

1. ADMINISTRACION DE ETOH A ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En los experimentos descritos en este proyecto, se utilizó la dieta y el diseño metodológico para su administración propuestos por Lieber-DeCarli (24), la dieta se obtuvo de Bio-Serv, Frenchtown NJ y se usó de acuerdo a sus instrucciones.

Los animales fueron divididos de acuerdo al diseño experimental en 4 grupos, cada grupo integrado por 6 ratones. los grupos I y III fueron alimentados con dieta líquida con 37% de etanol y los grupos II y IV con dieta líquida en donde se reemplazó isocalóricamente al etanol con carbohidratos como testigo. Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6, en celdas individuales, con peso promedio de 20-25 gr.

Los 4 grupos de animales fueron alimentados inicialmente con dieta líquida libre de etanol por 24 hrs. para acostumbrarlos a tomar la dieta por sí mismos. En el primer día del estudio, los grupos I y III fueron alimentados colocando en los bebederos 20-25 ml. de dieta/EtOH, y los grupos II y IV fueron alimentados con 10 ml. de dieta testigo. Por experiencias previas (19-16), se sabe que los ratones tratados con EtOH beben aproximadamente 10 ml al día, razón por la cual se inició la dieta líquida de los grupos testigo con 10 ml. en el primer día con el objeto de igualar la cantidad de nutrientes en todos los grupos.

En el segundo día del estudio, se determinó la cantidad consumida por cada uno de los ratones los grupos I y II obteniéndose el promedio de los grupos por día, alimentando a los grupos II y IV con la misma cantidad más 3 ml. para compensar la dieta que no es posible obtener ya que se encuentra por debajo del nivel del tubo de drenaje. Este mismo proceso se continuó durante el resto del estudio.

Se determinó la concentración de EtOH en sangre periférica en todos los animales durante los diversos experimentos con el equipo de EtOH en sangre de Sigma Chemical Company (Saint Louis MO) de acuerdo a la metodología indicada por el fabricante. Para determinar el control de calidad en los experimentos, los estándares fueron obtenidos también de Sigma Chemical Company, y se incluyeron en cada determinación. Al mismo tiempo se determinó diariamente el peso de los animales.

2. EFECTOS DEL ETANOL DE LA RESPUESTA INMUNE.

Los efectos del etanol en la respuesta inmune fueron estudiados mediante diferentes parámetros inmunológicos a los 7 y 14 días después de iniciar la administración de EtOH, estos estudios se desglosan a continuación:

2.1 CUANTIFICACION CELULAR EN TIMO Y BAZO.

Al finalizar los diferentes tiempos de administración de EtOH en los cuatro grupos de ratones, éstos fueron sacrificados por dislocación cervical. Timo y bazo fueron removidos asépticamente y se colocaron en solución salina balanceada de Hank (HBSS), libre de calcio y magnesio suplementada con N-2 hidroxietilpiperazina-N-2 etano ácido sulfónico (HEPES) y 50 mg/ml de gentamicina. Se hicieron suspensiones celulares de los órganos de acuerdo a métodos previamente estandarizados. Las suspensiones celulares se lavaron dos a tres veces con HBSS y se determinó el número

de células nucleadas con un contador electrónico de células (Coulter, Model ZM, Coulter Electronics, Hialeah, FL).

2.2 PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON MITOGENOS.

A los linfocitos obtenidos del bazo se les evaluó su capacidad de proliferar en respuesta a mitógenos específicos de células T y de células B (14-16). La cantidad de células del bazo se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/ml en RPMI 1640 (Biofluids, Rockvillw, MD) al que se le agregó HEPES 24 mm, glutamina al 1%, 50 ug/ml de gentamicina, 2 ME 5×10^{-5} y suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT) 5% previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos. (Medio de cultivo enriquecido) (MCE).

Estas células se cultivaron a una concentración de 5×10^5 células/0.1 ml/pocillo en placas de microcultivo con 96 pocillos y fondo plano (Costar, Plastics, Boston MA).

2.2.1. RESPUESTA A MITOGENOS:

Los cultivos se dividieron en tres grupos con muestras por cuadruplicado, a cada cultivo se le agregó: a) 0.1 ml de medio de cultivo enriquecido (MCE) como testigo, b) 0.1 ml de concaivalina A (Con A; Cal Biochem, La Joya, CA) a una concentración de 0.1 ug/ml y c) Lipopolisacárido bacteriano (LPS; Difco, Detroit, MI) de E.Coli 011:B4 a una concentración de 50 ug/ml, y se incubaron a 37 C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 hrs; 6 horas antes de terminar el último día de cultivo se agregó 1 uCi de timidina tritiada (³H TdR, actividad específica 5 Ci/mM; ICN, Chicago, IL).

Los cultivos fueron colectados en fragmentos circulares de papel filtro mediante un colector de muestras automático (PHD, Cell Harvester, Cambridge Technology, INC, Cambridge, MA). La radioactividad incorporada se determinó por centelleo líquido. La respuesta proliferativa a los diversos mitógenos fueron expresadas como cuentas netas por minuto (nCPM), calculadas al restar las CPM de los cultivos que recibieron únicamente MCE de las CPM obtenidas de los cultivos que recibieron mitógenos.

2.2.2. RESPUESTA LINFOCITARIA MIXTA:

En las células del bazo también se determinó su reacción a aloantígenos en respuesta linfocitaria mixta (MLR); de las células del bazo obtenidas como se describió previamente, se cultivaron con células del bazo de ratones Balb/c (H2^d) previamente irradiadas (2500 rad proveniente de Co⁶⁰) manteniéndose en cultivo a 37°C durante 120 Hrs.

La proliferación se determinó por incorporación de ³ H-TdR como se describió previamente.

3. CLONACION DE LINFOCITOS B REACTIVOS A LPS EN DISCOS DE PAPEL FILTRO (73).

Se evaluó la capacidad de respuesta de las células del bazo a LPS en los cuatro grupos en estudio mediante la técnica de clonación de células de bazo en discos de papel filtro para el conteo y la caracterización de las células B.

3.1 MEDIO DE CULTIVO

Se removieron los bazos y timos de los cuatro grupos de ratones, obteniendo suspensiones celulares, las cuales fueron lavadas con medio de lavado (ML) que se obtiene al diluir el medio de cultivo enriquecido (MCE) 1:10 en RPMI 1640.

Las suspensiones células se cultivaron en MCE de acuerdo a la metodología previamente descrita, agregando al medio de cultivo Hibridoma Origen Factor (Origen, Fisher Co.) a una concentración de 2.5% denominando a este medio. Medio de Cultivo Suplementado (MSC).

3.2 MITOGENO

Lipopolisacárido bacteriano (LPS) de E.Coli 0127:B8 (Difco, Detroit, MI) fue preparado mediante diálisis contra 3 ciclos de agua destilada a 4°C durante tres días, liofilizado y reconstituido a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada. Una vez obtenido el LPS se esterilizó a 100°C durante 2 Hrs. para usarse en los cultivos a una concentración final de 20 mg/ml.

3.3 DISCOS DE PAPEL FILTRO

Para la clonación de las células B se utilizaron discos de papel filtro Whatman 54 estériles de 8.26 cm. de diámetro como sustrato (Whatman Paper Division, Clifton, NJ); antes de usarse, cada disco se numeró con lápiz y se esterilizó en autoclave.

3.4 METODO DE CULTIVO

En condiciones estériles, los discos de papel filtro fueron colocados con el número hacia arriba dentro de las cajas de Petri (100x200 mm, Difco, Detroit, MI), y se les agregaron 5 a 10 ml de ML, dejándose reposar durante 30 minutos; células del bazo y del timo/PS fueron colocadas en un procedimiento de dos fases, dejando aclarado que los cultivos de células del bazo utilizadas en cada disco corresponden a cultivos individuales de cada uno de los ratones de cada grupo, realizando estos cultivos por

duplicado, y las células del timo corresponden a una mezcla de células obtenidas únicamente de ratones testigo.

En la primera fase se agregaron 5 ml de MCS que contenía 2×10^4 células del bazo, colocando la suspensión en zig-zag lentamente, con el propósito de cubrir todo el disco. El disco se cubrió con la caja de Petri permitiendo el asentamiento de las células sobre su superficie durante 30 minutos a temperatura ambiente sin mover el disco.

La segunda fase consistió en agregar otros 5 ml de MCS que contenía células de timo (5×10^6 células) y LPS a una concentración al doble de la final deseada, nuevamente se aplicaron las células gota a gota en zig-zag sobre la superficie del disco hasta cubrir toda su superficie. Los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 7% durante cinco días.

3.5 OBSERVACION DE LAS COLONIAS DE CELULAS B.

Al finalizar los cinco días de cultivo, el medio de cultivo es aspirado de la caja de Petri, agregándosele 5 ml de formol al 10% amortiguado con fosfatos a pH 7.4. El procedimiento de fijación se realizó durante 7 minutos a temperatura ambiente; posteriormente la solución de formol fue removida y el disco de papel filtro se lavo por dos ocasiones con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 diluida 1:10 en agua destilada. Se removió un fragmento de 1x2 cm. del disco y se tiñó con la técnica de Weight durante 2 minutos. se lavo con agua destilada. se deshidrató en cuatro cambios de etanol absoluto, se aclaró con Xilol y se montó en portaobjetos con medio Permunt (Sigma Chemical Co, San Luis Mo).

4.-RESPUESTA INMUNE A FOSFORICOLINA PARA EL ANALISIS DE LA RESPUESTA T-INDEPENDIENTE

La habilidad de las células B para producir anticuerpos específicos en contra de un antígeno TI fue evaluada después de proporcionar un estímulo antigénico mediante inmunización peritoneal con 20 ug de Streptococcus pneumoniae de la cepa R36A inactivada por calor (73-74-75-76).

4.1 OBTENCION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE R36A (77)

Se cultivaron Streptococcus pneumoniae de la cepa R36A (ATCC) en medio de Todd-Hewitt y se colectaron durante su etapa de crecimiento exponencial, de acuerdo al método de Liu y Gotschilch (26) modificada por Anderson y McCarty (77). Una vez recuperada, la bacteria fue lavada por cuatro ocasiones con solución salina isotónica y posteriormente liofilizada en frascos estériles, para su reconstitución posterior con agua destilada estéril e inactivación en baño maría a 60°C durante 45 minutos; no se determinaron bacterias viables una vez finalizado el procedimiento. La suspensión de

bacterias fue ajustada a una concentración de 100 ug de liofilizado bacteriano/ml de solución salina isotónica y se almacenaron a 4°C hasta su utilización posterior.

4.2 CELULAS FORMADORAS DE PLACA

Las células del bazo obtenidas se ajustaron a una concentración de 10^6 células /ml para ser utilizadas en la demostración de células de formadoras de placa (PFC) por técnica de hemolisis de placa modificada de Cunningham-Szeberg (78).

Como células indicadoras de hemolisis, se usaron eritrocitos de carnero (SRBC) cubiertos con diazo-p-aminofenilfosforilcolina (DPPC) donadas por el Dr. Jan Cerny de UTMB Galveston, Tex. (79-80). Una vez obtenidos los eritrocitos de carnero fueron lavados inicialmente durante dos ocasiones con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y posteriormente durante dos ocasiones con solución amortiguadora de boratos pH 9.2, para finalmente resuspenderlos al 20% en solución amortiguadora de boratos; posteriormente se agregaron 100 ul de DPPC a 5 ml de la suspensión mezclando vigorosamente, dejándose a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitándola ocasionalmente. Al finalizar las células fueron lavadas durante dos ocasiones con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y se resuspendieron al 10^5 para su uso en la técnica de hemolisis de placa.

Las suspensiones de células del bazo de cada ratón de los grupos III y IV fueron ensayadas por duplicado.

Las cámaras de incubación se prepararon aplicando 3 fragmentos de cinta plástica adhesiva en las dos caras en un porta objetos para dividirlo en dos áreas similares; un segundo portaobjetos fue presionado sobre el primero.

La mezcla de los reactivos se realizó en microplacas de 96 pocillos de acuerdo al siguiente esquema:

- a) 100 ul de solución amortiguadora de fosfatos.
- b) 50 ul de suspensión de células linfoides a una concentración de 10^6 células/ml.
- c) 20 ul de suspensión de eritrocitos de carnero a una concentración de 10% y
- d) 20 ul de complemento de cobayo a una dilución de 1:2.

La suspensión celular fue mezclada y colocada por capilaridad en ambas cámaras, las cámaras fueron selladas sumergiendo los extremos en una mezcla líquida de cera y parafina. Las cámaras se colocaron en un soporte y se incubaron a 37°C durante 2 hrs. La formación de placas pudo ser observada a simple vista o bajo un microscopio de

disecciones. Como testigo, se utilizaron eritrocitos de carnero no conjugados y en ellos se determinó la formación inespecífica de placas.

4.3 TECNICA DE INMUNOTRANSFERENCIA

Discos de nitrocelulosa de 8.6 cms. de diámetro (Millipore Bedford, Massachusetts) fueron sumergidos en agua destilada y transferidos a SSC (amortiguador de transferencia) 1x (NaCl 0.15 M/citrato de sodio 0.015 M pH 7.5). Los discos de nitrocelulosa fueron incubados durante toda la noche a 4°C en SSC que contenía 150 ul/ml de fostirilcolina-BSA (PC₃BSA) producido por Dr. Kelsoe (Galveston, Tex.). El volumen de esta solución se ajustó a una concentración total de proteínas de 800 ug/disco de nitrocelulosa; la cantidad de proteína absorbida al disco de nitrocelulosa se pudo incrementar añadiendo metanol al 10% a la solución amortiguadora de absorción. Cualquier remanente de antígenos proteicos no específicos en el disco de nitrocelulosa se bloqueó mediante la incubación de éste en medio de cultivo durante 2 horas de temperatura ambiente.

Una vez finalizado el tiempo de absorción, los discos se lavaron con HBSS y se colocaron individualmente en cajas de Petri cubriéndose con 5 ml de medio de cultivo.

Una vez finalizados los 5 días de cultivo, los discos de papel filtro utilizados para el crecimiento de colonias de células B se retiraron del cultivo y se enjuagaron cuidadosamente dos veces con el medio de lavado, colocándose con la superficie del disco usada para el desarrollo de colonias sobre la superficie del disco de nitrocelulosa cubierto con PC₃BSA añadiéndose medio de cultivo con 5% de leche en polvo para obtener una capa delgada de medio sobre la superficie de los discos.

Una vez cerradas, las cajas de Petri se incubaron durante 3 horas a 37°C en medio ambiente húmedo. Una vez finalizada la incubación, el disco de papel filtro se puso nuevamente en contacto con otro disco de nitrocelulosa con PC₃BSA absorbido en su superficie.

Para determinar la especificidad de las colonias de células formadoras de anticuerpos, en la segunda incubación del mismo disco se añadió al medio de cultivo PC₁₆BSA a una concentración de 150 ug/ml, lo cual bloquea la formación de uniones entre los anticuerpos presentes en la superficie de las colonias de células B y el antígeno absorbido en el disco de nitrocelulosa.

Subsecuentemente, los discos de papel filtro se removieron y los discos de nitrocelulosa se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con 5% de leche en polvo, 0.05% Tween 20 y 0.01% de dodecil sulfato de sólido (SDS). Una vez lavados los discos de nitrocelulosa se cubrieron con anticuerpos anti-IgM marcados con fosfatasa

alcalina (ABC-AP Kit Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) diluidos en PBS, incubándose durante toda la noche a 4°C, lavándose posteriormente con PBS, 0.05% Tween 20 y 0.01% SDS.

La actividad enzimática fue determinada con sustrato específico para fosfatasa alcalina (Alkaline phosphatase substrate kit, Vector laboratories Inc. Burlingame, CA), incubándose durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo enjuagando los discos con agua destilada y la positividad se observó como marcas de color violáceo; la localización y conteo de las placas fue realizada con los discos en seco.

RESULTADOS

1. NIVELES SANGUÍNEOS DE EtOH Y PESO CORPORAL EN ANIMALES TRATADOS CON EtOH

Los hallazgos obtenidos en este estudio demuestran que fuimos capaces de mantener niveles elevados de EtOH en sangre durante el tiempo de estudio, demostrando niveles de $207.15 \text{ mg/d} \pm 53.7$ a los 7 días y $175.8 \text{ mg/d} \pm 95.83$ a los 14 días (tabla 1).

Al determinar el peso en los grupos no se observan grandes variaciones entre los grupos de ratones alimentados con dieta líquida con etanol al comparar con los grupos de dieta líquida control (figura 1).

CUADRO I

Niveles sanguíneos de EtOH en ratones C57b1/6
mg/dl

Días	Testigo	EtOH
7	36.3 ± 25.02	207.15 ± 53.7
14	25.9 ± 10.4	175.8 ± 95.83

Todos los valores de niveles sanguíneos de etanol son promedios + DS; cada grupo es de 12 ratones/gpo.

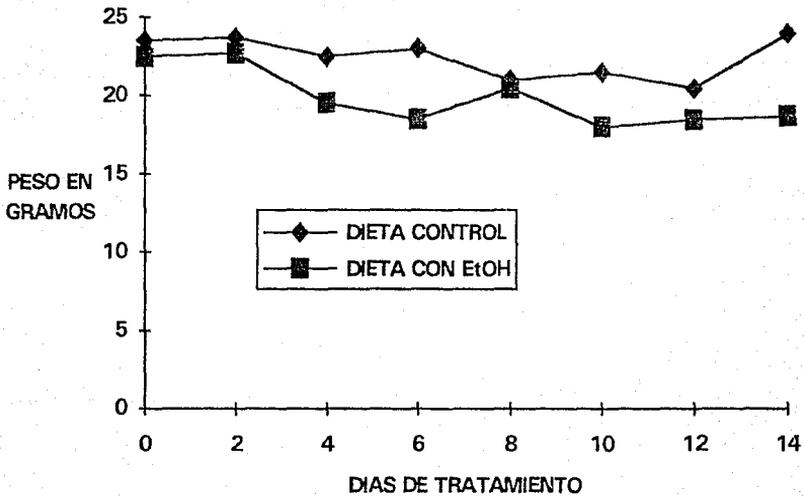


FIGURA 1 Efecto de la ingestión de EtOH en el peso corporal de ratones machos de la cepa C57B1/6. Cada punto representa el promedio de los 12 ratones de cada grupo.

2. CUANTIFICACION CELULAR DE ORGANOS LINFOIDES.

Se determinó el número de células nucleadas en el bazo y el timo de cada grupo. Se observa que los 7 días los grupos tratados con etanol tenían un promedio de 1.2×10^6 células/ml, con una desviación estándar de 0.6 en el bazo mientras que los grupos testigo muestran un promedio de 3.3×10^6 células/ml con una desviación estándar de $+1.2 \times 10^6$ células/ml.

El número de linfocitos observados en el timo a los 7 días de tratamiento con etanol fue de 1.6×10^6 células/ml., con una desviación estándar de 0.6, mientras que en grupo testigo fue de 7.8×10^6 células/ml con una desviación estándar de 1.2×10^6 células/ml

Los resultados obtenidos a los 14 días posteriores al tratamiento con etanol muestran cambios similares encontrando que el número de células en el bazo en ratones tratados con etanol es de 1.7×10^6 células/ml con una desviación estándar de 0.29×10^6 células/ml., mientras que en el grupo testigo se encontró un promedio de 4×10^6 células/ml. con una desviación estándar de 1.8×10^6 . De la misma manera el timo presenta cambios similares que los encontrados a los 7 días, con un promedio en los grupos de ratones tratados con alcohol de 2×10^6 con una desviación estándar de 0.8×10^6 células/ml., en tanto que los grupos tratados con dieta líquida control muestran un número de 8.6×10^6 células/ml. con una desviación estándar de 2.2×10^6 células/ml.

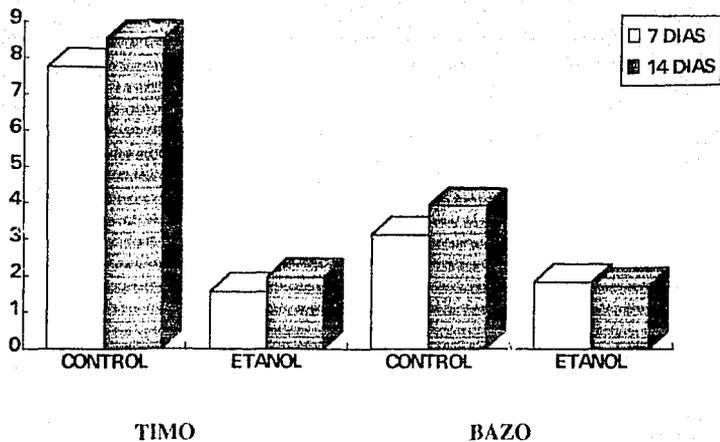


FIGURA 2 Efecto de la ingestión de EtOH en el número de células en bazo y timo. Grupos de 6 ratones de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con dieta líquida etanol o dieta líquida testigo durante 7 y 14 días. Cada punto representa el promedio de los ratones de cada grupo más el error estándar del promedio.

3. PROLIFERACION DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON MITOGENOS Y ALOANTIGENOS.

Los resultados obtenidos en la respuesta proliferativa de células del bazo a diferentes activadores se muestran en las figuras 3 y 5.

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos por la activación de las células del bazo a concavalina A, encontrando a los 7 días de iniciado el tratamiento con dieta líquida con alcohol en los grupos I y III, un promedio de 9.85×10^3 CPM con una desviación estándar de 1.75, mientras que en los grupos tratados con dieta líquida control esta respuesta presenta un promedio de 12.75×10^3 CPM con una desviación estándar de 2.5. Los resultados obtenidos a los 14 días de iniciado el tratamiento demuestran una respuesta proliferativa de 6.35×10^3 CPM con una desviación estándar de 4.20, mientras que el promedio de los grupos controles es de 14.25×10^3 CPM, con una desviación estándar del promedio de 4.25.

En la figura 4 se observan los resultados obtenidos en la respuesta proliferativa de las células de bazo de ratones tratados durante 7 días con dieta líquida con alcohol a activación con aloantígenos, encontrando un promedio de 1.8×10^3 CPM con una desviación estándar de 0.05, mientras que en los ratones tratados con dieta líquida control presentan un promedio de 5.2×10^3 CPM con una desviación estándar de 0.45. Los grupos de ratones tratados con dieta líquida etanol durante 14 días muestran una respuesta de 1.06×10^3 CPM, con una desviación estándar de 0.02, mientras que los grupos alimentados con dieta líquida control muestran un promedio de 11.15×10^3 CPM con una desviación estándar de 1.75.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos de la activación de células del bazo con lipopolisacárido bacteriano de E.Coli encontrando que esta respuesta después de 7 días de iniciado el tratamiento de grupos alimentados con dieta líquida, etanol presenta un promedio de 6.25×10^3 CPM con una desviación estándar de 2.1, mientras que en los ratones tratados con dieta líquida control el promedio es de $7.45^3 \times 10$ CPM con una desviación estándar de 1. Los grupos tratados durante 14 días con dieta líquida/etanol muestran un promedio de la respuesta proliferativa de 5.40×10^3 CPM, con una desviación estándar de 2, en tanto que los grupos de ratones alimentados con dieta líquida control muestran un promedio de 6×10^3 CPM con una desviación estándar de 1.

RESPUESTA DE C57BL/6 A CON A

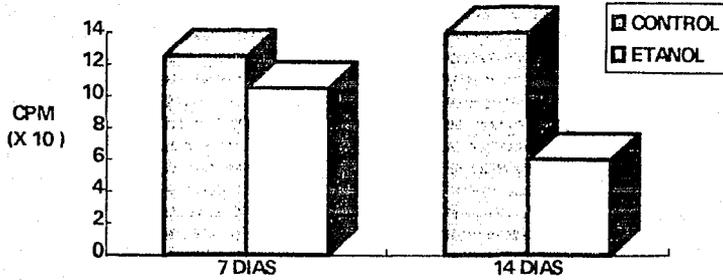


FIGURA 3. Proliferación de células del bazo activadas con concanavalina A (0.1 ug/ml) de grupos de ratones de la cepa C57B1/6 alimentados con dieta líquida/etanol o dieta líquida control durante 7 y 14 días. Cada punto representa el promedio de la respuesta de 12 ratones de cada grupo más la desviación estándar.

RESPONSABLE DE C57BL/6 A LOANTIGENOS

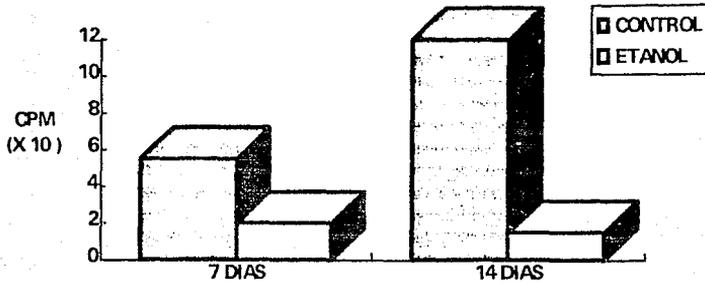


FIGURA 4 Efecto del etanol en la proliferación de células de bazo activadas con aloantígenos. Las células del bazo fueron obtenidas de ratones machos de la cepa C57B1/6 alimentados con dieta líquida etanol o dieta líquida control durante 7 y 14 días. Cada punto representa el promedio de cuentas por minuto más la desviación estándar del promedio de los cultivos por cuadruplicado.

RESPUESTA DE C57BL/6 A LPS

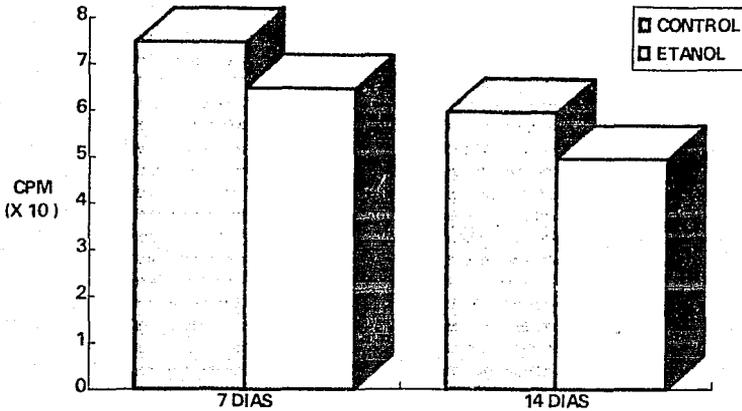


FIGURA 5 Efecto del EtOH en la respuesta proliferativa de las células del bazo a lípolisacárido bacteriano de E.Coli a una concentración de 50 ug/ml. Los ratones utilizados fueron ratones machos de la cepa C57B1/6 alimentados con dieta líquida con alcohol o dieta líquida control. La respuesta proliferativa fué determinada a los 7 y 14 días después de iniciado el tratamiento. Cada punto representa el promedio de 12 ratones de cada grupo más la desviación estándar del promedio.

4. FUNCIONAMIENTO DE CELULAS B.

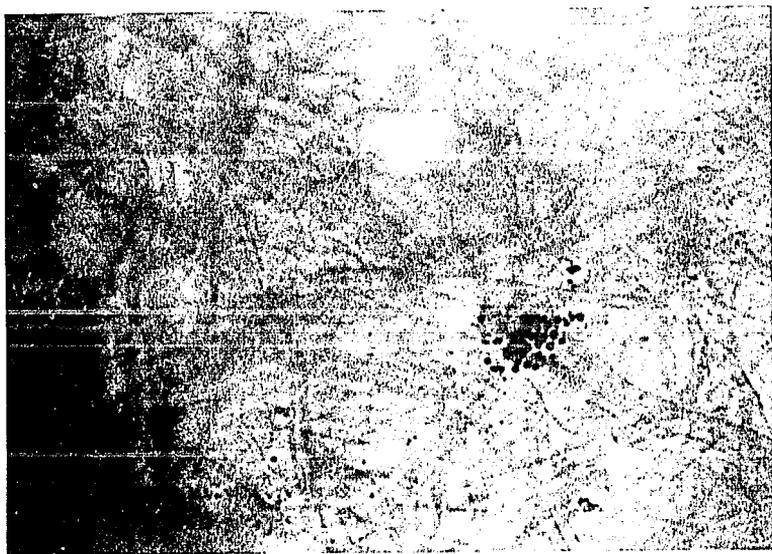
a) CLONACION DE CELULAS B REACTIVAS A LPS EN DISCOS DE PAPEL FILTRO

En la figura 6 se presentan los datos obtenidos con la técnica de clonación de células B reactivas a LPS en discos de papel filtro. En esta figura se muestra únicamente la formación y el crecimiento de colonias en discos de papel filtro usados como sustrato en cultivos celulares mantenidos durante 5 días. Las colonias de células B crecen asincrónicamente como se muestra en la figura, ya que se observan variaciones en el tamaño de las colonias.

Los datos presentes en la figura 7 muestran cambios significativos en el número de células capaces de responder a la activación con LPS de acuerdo al número de colonias producidas en los grupos de experimentación a los 7 y 14 días después de iniciado el tratamiento con dieta líquida alcohol o dieta líquida control. Los datos obtenidos a los 7 días en el grupo tratado con dieta líquida/alcohol muestran un número de colonias/disco de 13.5×10^3 , con una desviación estándar de 0.75, mientras que los grupos controles muestran un número de colonias de 10.95×10^3 con una desviación estándar de 1.15. Los resultados obtenidos a los 14 días muestran una respuesta similar a la anterior, ya que los grupos de ratones tratados con alcohol presentan un promedio de 9.1×10^3 con una desviación estándar de 2.15, mientras que los grupos tratados con dieta líquida control muestran un promedio de 7.65×10^3 con una desviación estándar de 1.15.

FIGURAS 6a Y 6b

Microfotografía que muestra colonias de células B dependientes de LPS obtenidas a los 5 días de cultivo. Las células activadas crecieron asincrónicamente dentro de la matriz de las fibras de celulosa. Las células pequeñas con tinción más intensa corresponden a timocitos. Las colonias fueron fijadas y tenias con tinción Wriqh/Giemsá.



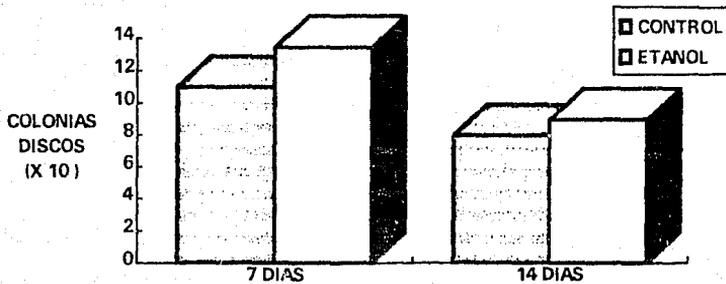


FIGURA 7 En esta gráfica se comparan los efectos de la ingestión de EtOH en la formación de colonias de células B dependientes de LPS en discos de papel filtro, con la formación de colonias en el grupo de ratones alimentados con dieta líquida control. Los resultados muestran el promedio del número de colonias/disco de 12 ratones de la cepa C57B1 en cada grupo más el promedio de la desviación estándar.

b) RESPUESTA T INDEPENDIENTE

Para determinar el efecto del alcohol en la producción de anticuerpos específicos en contra de fosforilcolina (PC), antígeno T independiente de las células T cooperadoras y proveer la determinación cuantitativa de la función intrínseca de las células B, se inmunizaron ratones machos de la cepa C57B1/6 con Streptococcus pneumoniae R36A inactivado por calor, después de 2 y 9 días de iniciado el tratamiento en los grupos de ratones alimentados con dieta líquida etanol o dieta líquida control. Se determinó la presencia de anticuerpos IgM específicos contra PC producido por células B mediante las técnicas de formación de hemólisis de placa de Inmunotransferencia 5 días después de realizada la inmunización.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos mediante la técnica de hemólisis encontrando que el número de placas de hemólisis en los grupos de ratones tratados con alcohol durante 7 días presenta un promedio de 430 con una desviación estándar de 115, mientras que los grupos tratados con dieta líquida control presentan un promedio de 560 con una desviación estándar de 285.

Los resultados obtenidos después de 14 días de tratamiento muestran en los grupos tratados con etanol un promedio de 465 plazas con una desviación estándar de 115, mientras que el grupo testigo muestra un promedio de 355 con una desviación estándar de 175.

Las figuras 9 a, b y c muestran los resultados obtenidos mediante la inmunotransferencia de los discos de papel filtro utilizados como sustrato en el crecimiento de colonias de células B sobre discos de nitrocelulosa absorbidos con PC y detectando las colonias productoras de anticuerpos específicos en contra de PC mediante anticuerpos anti-IgM marcados con fosfatasa alcalina, demostrando en la figura 9c la especificidad de la técnica al inhibir la formación de placas mediante el uso de PC libre en el medio de cultivo al momento de iniciar la inmunotransferencia.

Los datos en el cuadro dos muestran el número de colonias de células B dependientes de LPS obtenidas de grupos de ratones alimentados con dieta líquida etanol y dieta líquida control durante 7 y 14 días y detectados mediante técnicas histológicas estándar comparando con el número de colonias PC específicas de los mismos discos detectadas mediante la técnica de inmunotransferencia. Los resultados muestran un número de colonias a los 7 días en ratones tratados con dieta/etanol de 5840 con una desviación estándar de 975 con un promedio de placas PC específicas de 359 con una desviación estándar de 95 (6.1% del total de colonias), mientras que los grupos de ratones tratados con dieta líquida control muestran un número de colonias de 6275 con una desviación estándar de 1495, con un promedio de placas PC específicas de 400 con una desviación estándar de 60 (6.3% del total de colonias).

Los resultados obtenidos a los 14 días de tratamiento muestran resultados similares, encontrando que el promedio en la formación de colonias de los grupos de ratones alimentados con dieta líquida etano es de 12,585 con una desviación estándar de 1500, mientras que las colonias PC específicas son 408 con una desviación estándar de 105 (3.2% del total de colonias), en tanto que el número de colonias obtenidas en el grupo testigo es de 18,022 con una desviación estándar de 1250; las colonias PC específicas presentan un promedio en este grupo de 448 con una desviación estándar de 70 (2.4% del total de colonias).

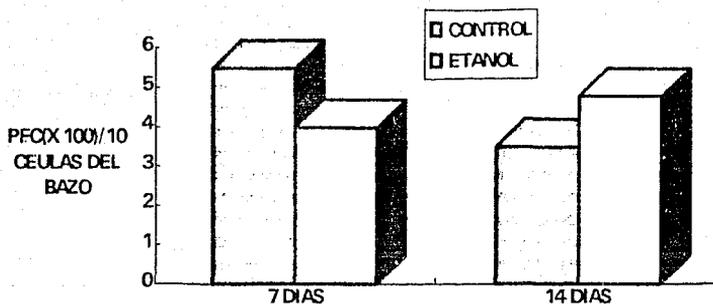
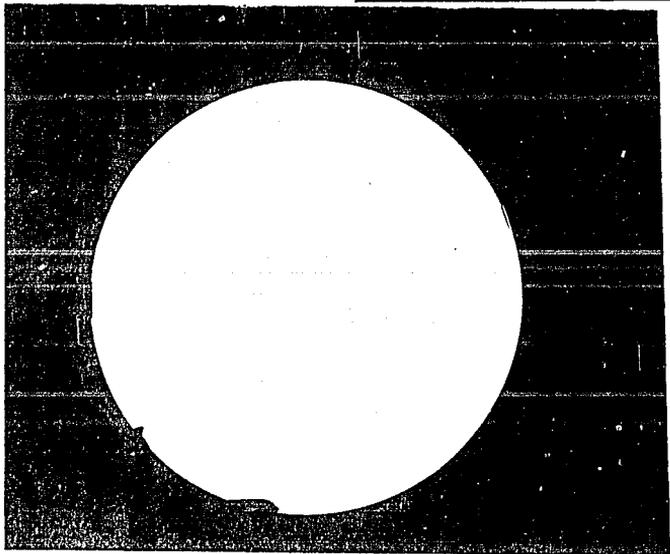
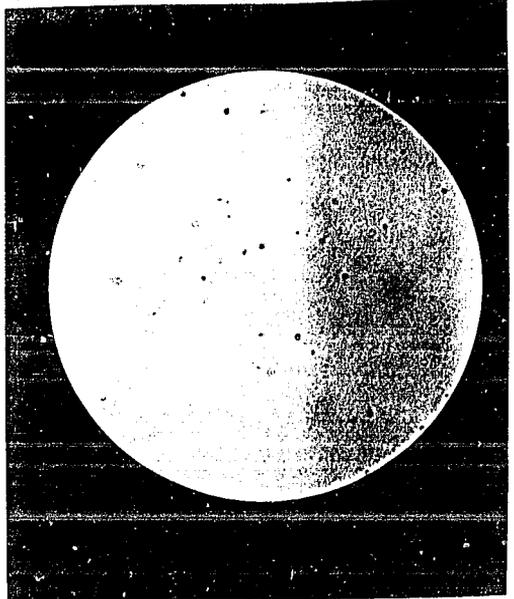
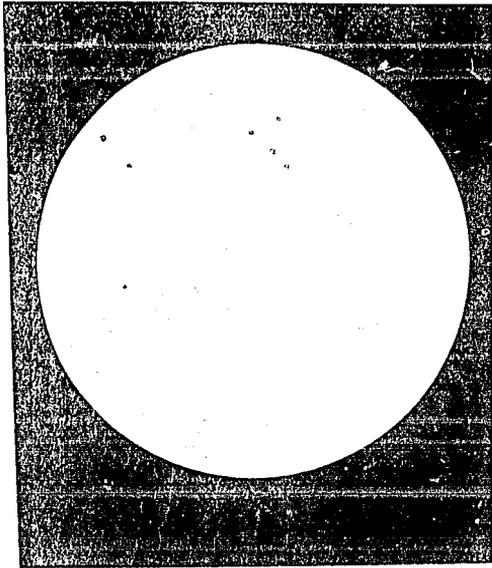


FIGURA 8. Comparación del número de células formadoras de placa obtenidas de los ratones tratados con dieta líquida etanol o dieta líquida control durante 7 y 14 días después de iniciado el tratamiento e inmunizados con PC 5 días antes de finalizado el esquema de tratamiento. Cada barra representa el promedio de célula formadoras de placa de 6 ratones de cada grupo más la desviación estándar de la medida de cuentas por duplicado.

FIGURA 9.

Inmunotransferencia en papel. Cada figura representa placas de inmunotransferencia de a) ratones de la cepa C57B1/6 tratados con dieta líquida con alcohol, b) Ratones de la misma cepa tratados con dieta líquida control y 3) Inhibición de la formación de placas específicas mediante el uso de PC₁₆BSA.



CUADRO 2

Efecto del etanol sobre la respuesta inmune

Técnica de inmunotransferencia en papel. Anticuerpos anti-PC.

7 DIAS		
	TESTIGO	EtOH
Número de colonias/disco	6,275 + 1,425	5,840 ± 975
Inmunotransferencia	400 + 60	359 ± 95

14 DIAS		
	TESTIGO	EtOH
Número de colonias/disco	18,022 + 1250	12,585 ± 1,500
Inmunotransferencia	448 + 70	408 ± 105

Las cuentas representan el promedio de cada grupo más la desviación estándar.

DISCUSION

Las infecciones, las neoplasias y el daño hepático crónico son causas comunes de morbilidad y mortalidad en los pacientes alcohólicos. Todas estas enfermedades pueden estar bajo la influencia de las alteraciones de la respuesta inmune: sin embargo, no se ha determinado si estas alteraciones en la respuesta inmune son debidas a los efectos del alcohol per se o a otras complicaciones frecuentemente asociadas con el alcoholismo (1-5).

Se han demostrado alteraciones en diversos niveles de los mecanismos de la defensa del hospedero como disfunción en el movimiento ciliar en el tracto gastrointestinal y tracto respiratorio superior (6-11): en la respuesta inmune no específica, tales como alteraciones funcionales de los granulocitos, macrófagos y células asesinas naturales (6-11).

De particular interés son los estudios que han establecido que el etanol tiene un efecto mayor sobre la respuesta inmune específica (14-18). En estudios con pacientes alcohólicos, se ha demostrado una marcada alteración en el desarrollo y en la expresión de la respuesta inmune mediada por células asociada con la disminución en la respuesta de hipersensibilidad retardada (14), disminución en el número de cuentas linfocitarias (15) y supresión de la transformación blastoide (16-18). Los efectos en la respuesta inmune humoral son menos evidentes, pero la respuesta inmune a nuevos antígenos está alterada (14-18).

Tanto en los modelos de animales de experimentación como en el limitado número de estudios en humanos, se ha demostrado que el etanol tiene un profundo efecto sobre la respuesta inmune específica. Inicialmente en nuestro laboratorio, se empleó la técnica de entubación gástrica de las ratas como método para la administración del etanol y se demostró que había una marcada disminución de la respuesta proliferativa de los linfocitos a estímulos no específicos, tales como a concanavalina A, lipopolisacárido bacteriano y a estímulos específicos tales como células alogénicas (14-81). Sin embargo estos cambios pudieran estar relacionados con los cambios producidos por el incremento en la producción de glucocorticoides inducidos por el stress. Para examinar esa posibilidad se estudió la respuesta inmune en ratas tratadas con alcohol y adrenalectomizadas, con lo que se demostró que la respuesta inmune persistía suprimida, lo que sugiere que algunos, aunque no todos los aspectos de la inmunosupresión asociados con la administración del alcohol son debidos a la producción de esteroides (81).

Otro modelo experimental utilizado en nuestro laboratorio fue el modelo de administración de etanol por inhalación; en éste no se presenta inhibición en la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos no especificados y al comparar este modelo con los resultados de la supresión en la respuesta proliferativa encontrados en el

modelo de administración del etanol por intubación, se observó en ambos la misma concentración de etanol en sangre (82).

En cambio el modelo experimental propuesto por Lieber-DeCarli. (24) nos proporcionó importantes ventajas:

- 1) El etanol se ingiere por vía oral, lo que permite que el etanol siga rutas metabólicas normales sin producir stress.
- 2) Se pueden usar ratones de la misma camada y con el mismo tipo de administración de la dieta sin cambios en el total de la ingesta calórica.
- 3) Estos animales de experimentación se encuentran en buenas condiciones nutricionales. desarrollan esteatosis hepática, pero sin llegar a desarrollar cirrosis ni alteraciones funcionales hepáticas que pudieran favorecer cambios en la respuesta inmune independiente del efecto del etanol per se.

Utilizando el modelo propuesto por Lieber-DeCarli en el presente trabajo, se observa una marcada disminución en la respuesta proliferativa de las células del bazo de ratones tratados con etanol a activadores específicos de células T tales como concanavalina A y antígenos alogénicos, en contraste, la respuesta proliferativa a lipopolisacárido bacteriano de E. Coli, activador específico de células B se encuentra ligeramente aumentada en los ratones alimentados con dieta con alcohol, y esta respuesta presenta cambios similares durante los diferentes tiempos estudiados, lo que nos permite sugerir que el efecto tóxico del etanol y/o sus metabolitos pudiera ser directamente sobre células T.

El efecto del etanol en la respuesta inmune se manifiesta inicialmente con disminución en el número de linfocitos del timo y otros órganos linfoides periféricos, aunque el mecanismo de este defecto es desconocido, la pérdida de linfocitos pudiera ser de gran importancia (81).

Por otra parte, los hallazgos de Watson y Col (22), así como datos en nuestro laboratorio (82), demuestran cambios en la población de células T, y al menos en modelos experimentales, las células T cooperadoras (T4) se encuentran profundamente disminuidas. Estos datos nos permiten concluir que uno de los factores de la supresión del sistema inmune es la disminución de las células T. Además se ha demostrado que los defectos funcionales persisten aun cuando el número de células de los órganos linfoides han recuperado sus valores normales (14). También en estudios previos en nuestro laboratorio, se demostró que el defecto en la proliferación de linfocitos producido por la administración de etanol, no se encuentra asociado a la habilidad de las células T de producir interleucina 2 (14,16,20,69), ya que ésta es producida de igual manera por los linfocitos de ratas tratadas con etanol como de las ratas tratadas con dieta testigo; sin embargo, las células T de las ratas tratadas con etanol fueron

incapaces de utilizar la IL-2. Esto sería una posible explicación de la incapacidad de proliferación de los linfocitos ante diversos estímulos (69).

Con el presente modelo experimental, se demostró que también la administración de etanol se encuentra asociada con la incapacidad de responder a antígenos T dependientes (TD).

El desarrollo de la respuesta a antígenos TD requiere en la mayoría de los casos, de una interacción compleja entre varios tipos de células del sistema linfóide y de la presencia de células accesorias. Ha sido demostrado que existe un subgrupo de células T que reaccionan de una manera positiva con otras células para producir la respuesta inmune (Células T cooperadoras). Estas células requieren de la presencia de células accesorias o presentadoras del antígeno para su respuesta, y que reconocen al antígeno nativo en la superficie de las células accesorias en asociación con moléculas HLA de la clase II; también se sabe que una vez reconocido el antígeno las células T reaccionan produciendo moléculas solubles o linfocinas que promueven la proliferación y la función efectora de las células T y su posterior cooperación con las células B para finalmente producir anticuerpos específicos contra el antígeno inductor (70-72).

Cualquier defecto en alguno de estos aspectos en la biología de la respuesta inmune resultaría en alteraciones de la misma; varios de estos defectos han sido notados en pacientes alcohólicos.

Nuestros resultados coinciden con los de otros laboratorios sobre los defectos en el funcionamiento de las células T. Otras publicaciones han demostrado alteraciones en la fagocitosis, mecanismo inicial para el procesamiento del antígeno en respuesta TD; sin embargo pocos trabajos han estado relacionados con el funcionamiento de las células B, en donde se señalan únicamente defectos en la respuesta inmune a antígenos TD.

Tomando en cuenta las diferentes subpoblaciones de células B capaces de responder a antígenos TD y a antígenos TI y la respuesta obtenida al retar a ratones tratados con etanol en contra de antígenos TD, se decidió buscar la respuesta a antígenos TI, teniendo como base la buena respuesta proliferativa de las células B a LPS.

Se eligió la técnica de clonación de linfocitos B respondedores a LPS en discos de papel filtro como un método eficaz en la enumeración y caracterización de las células B en la respuesta inmune específica. Con este método las células de bazo de los ratones inmunizados con *Streptococcus pneumoniae* R36A, son colocadas en bajas densidades en discos de papel filtro y activadas con LPS. Las células activadas proliferan y se diferencian para formar colonias, clonas de células hijas secretoras de anticuerpos, inmovilizadas dentro de la matriz de celulosa del papel filtro. Cada colonia representa la progenie de una célula B, la enumeración y caracterización de estas colonias mediante la inmunotransferencia en papel, que es más sensible que la hemólisis en placa, nos describió la población de células B del bazo productoras de anticuerpos específicos en contra de fosforilcolina, antígeno TI-2, sin el problema de la conjugación de los

eritrocitos de carnero con los antígenos, ni la hemólisis inespecífica producida por los cambios en el pH o por los eritrocitos almacenados durante largo tiempo, etc.

Al utilizar ambas técnicas, tanto la inmunotransferencia como la hemólisis en placa, encontramos que la respuesta proliferativa y la respuesta inmune inducida por antígenos TI de la clase 2 se encuentra intacta.

Podemos finalizar concluyendo que el efecto del etanol está dirigido directamente sobre las células T cooperadoras, aunque se deben tener en cuenta otras explicaciones alternas, tales como la disminución y/o alteraciones de las células T supresoras, disminución o alteraciones funcionales de subpoblaciones de células B capaces de responder a diferentes tipos de antígenos.

En suma, en este trabajo demostramos que alimentando durante 7 y 14 días con dieta líquida conteniendo 37% de alcohol, resulta en cambios demostrables en el sistema inmune; estos cambios fueron: Pérdida de células en los órganos linfoides primarios (timo y bazo) y disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos T a estímulos T-específicos. Este modelo también ha permitido demostrar que la respuesta inmune a antígenos TI-2 y la respuesta proliferativa a LPS, ambos estímulos específicos y marcados de la capacidad funcional de células B, no se encuentran alteradas.

BIBLIOGRAFIA

1. Baird MA. A scheme for determining the prevalence of alcoholism in hospitalized patients. *Alcoholism NY*. 13;782 (1989)
2. Cherpitel CJ. Prediction of alcohol related casualties among emergency room admissions. *Int J Addict*. 24;725 (1989)
3. Lange DE. Prevalence of alcohol related admissions to general medical units. *Int J Psychiatry Med* 19;371 (1989)
4. MacGregor RR. Alcohol and immune defense. *JAMA*. 256;1474 (1986)
5. Girard DE, Kumar KL, McAfee JH. Hematological effects of acute and chronic alcohol abuse. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1;321 (1987)
6. Bagastra O. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology*. 65;405 (1988).
7. Morland H. Reduced IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis in human monocytes isolated from alcoholics. *Alcoholism NY*. 12;755 (1988).
8. Watson R, Prabhala R, Darban H, Yahya D, Smith T. Changes in lymphocyte and macrophage subsets due to morphine and ethanol treatment during a retrovirus infection causing murine AIDS. *Life Sciences*. 42;840 (1988).
9. Meadows GG et al. Influence of ethanol consumption on natural killer cell activity in mice. *Alcoholism NY*. 13;476 (1989).
10. Irwin M et al. Major depressive disorder, alcoholism and reduced natural killer cell cytotoxicity. Role of severity of depressive symptoms and alcohol consumption. *Arch Gen Psychiatry*. 47;713 (1990).
11. Blank SE. Suppression of natural killer cell activity by ethanol consumption and food restriction. *Alcohol Clin Exp Res*. 15;16 (1991).
12. French SW, Miyamoto K, Ohta Y, Geoffrion Y. Pathogenesis of experimental alcoholic liver disease in the rat. *Meth Achiev Exp Pathol*. 13;181 (1988).
13. Lieber Ch. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med*. 319;1639 (1988).

14. Jerrells T, Smith W, Eckardt M. Murine model of Ethanol-induced immunosuppression. *Alcohol Clin Exp Res.* 14:546 (1990).
15. Watson R, Prabhala R, Abril E, Smith T. Changes in lymphocyte subsets and macrophage functions from high, short-term dietary ethanol in C57BL/6 mice. *Life Sciences.* 43:865 (1988).
16. Jerrells T, Peritt D, Marietta Ch, Eckardt J. Mechanisms of suppression of cellular immunity induced by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 13:490 (1989).
17. Bagasra O, Kajdacsy-Balla A. Ethanol-induced immunomodulations in chronic alcoholism. *Clinical Immunology Newsletter.* 9,1 (1987).
18. Bagasra O, Howeedy A, Dorio R, Kajdacsy-Balla A. Functional analysis of T-cell subsets in chronic experimental alcoholism. *Immunology.* 61:63 (1987).
19. Kaplan D. A novel mechanism of immunosuppression mediated by ethanol. *Cell Immunol.* 102:1 (1986).
20. Jerrells T. Ethanol associated immunosuppression. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 44:173 (1988).
21. Lundy J, Raff JH, Deakins S. The acute and chronic effects of alcohol on the immune system. *Surg Gynecol Obstet.* 141:212 (1975).
22. Watson Rr, Eskelson C, Hartmann BR. Severe alcohol abuse and cellular immune functions. *Arizona Med.* 41:665 (1984).
23. Gluckman SJ, Dvorak VC, MacGregor RR. Host defenses during prolonged alcohol consumption in a controlled environment. *Arch Int Med.* 137:1539 (1977).
24. Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: Two decades of applications and 1982 update. *Alcohol Clin Exp Res.* 6:523 (1982).
25. Brundish DE, Baddiley J. Pneumococcal C-substance, a ribitol teicoic acid containing choline phosphate. *Bioceh J.* 110:573 (1968).
26. Liu T, Gotschlich E. The chemical composition of pneumococcal C-polysaccharide. *J Biol Chem* 238:1928 (1963).
27. Jennings H, Lugowski C, Young N. Structure of the complex polysaccharide C-substance from *Streptococcus pneumoniae* type I. *Biochemistry.* 19:4712 (1980).

28. Yuan D. Regulation of the gene expression during B-cell differentiation in B lymphocyte differentiation. Cambier J. ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Flo. pp 23 (1986).
29. Linton PJ, Gilmore G, Klinman N. The secondary B cell lineage. B cell development. Alan R Liss Inc. pp 75 (1988).
30. Bottomly K. Workshop on idiotype regulation. B cell development. Alan R Liss Inc. pp 117 (1988).
31. Godin J, Scott D, Layton J. Genetics, cellular expression and function of IgD and IgM receptor. Immunol Rev. 37:152 (1977).
32. Warner N, Harris A, McKenzie I, Deluca D, Gutman G. Lymphocyte differentiation as analyzed by the expression of defined cell surface markers in Membrane receptors of lymphocytes. Seligmann M, Preudhomme J, Korylsky F eds. Elsevier New York. pp 203 (1975).
33. Monroe J, Cambier J. Cell cycle dependence for expression of membrane associated IgD, IgM and Ia antigen on mitogen-stimulated murine lymphocytes. Ann NY Acad Sci. 399:238 (1982).
34. Wang J, McClain D, Edelman G. Modulation of lymphocyte mitogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 72:1917 (1975).
35. Casten L, Morris J, Pierce S. The antigen presenting function of B cells. B cell Development. Alan R Liss Inc. pp 199 (1988).
36. Dennis K, Dorshkind K, Witte O. Analysis of B lymphocyte lineages and diversity using long term lymphoid cultures. B cell development. Alan R Liss Inc. pp 285 (1988).
37. Weigle W. Factors and events in the activation, proliferation and differentiation of B cells. CRC Critical Reviews in Immunology. 7:285 (1987).
38. Kincade P. Experimental models for understanding B lymphocyte formation. Adv Immunol. 41:181 (1987).
39. Roehm N, Leibson J, Zlotnik A, Murrack P, Kappler J. Helper signals in B lymphocyte differentiation, in B lymphocyte differentiation. Cambier J ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Flo, pp 61 (1987).
40. Wetzel G, Kettman J. Activation of murine B lymphocytes. J Immunol. 126:723 (1981).

41. Melchers F, Andersson J. The kinetics of proliferation and maturation of mitogen-activated bone marrow-derived lymphocytes. *Eur J Immunol.* 4:687 (1974).
42. Melchers F, Andersson J. Factors controlling the B-cell cycle. *Ann Rev Immunol.* 4:13 (1986).
43. Kettman J, Lefkovits I. Changes in the protein pattern of murine B cells after mitogenic stimulation. *Eur J Immunol.* In press.
44. Hongo T. Immunoglobulin genes. *Ann Rev Immunol.* 1:499 (1983).
45. Hurwitz J, Coleclough C, Cebra J. CH gene rearrangements in IgM-bearing B cells and in the normal splenic DNA component of hybridomas making different isotypes of antibody. *Cell.* 22:349 (1980).
46. Gillies S, Marrison S, Oi V, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell.* 33:717 (1983).
47. Monroe J, Cambier J. B cell activation. II. B cell plasma membrane depolarization and hyper-Ia antigen expression induced by receptor immunoglobulin cross-linking are coupled. *J Exp Med.* 158:1589 (1983).
48. LeBien T. Growing human B-cell precursors in vitro; the continuing challenge. *Immunol Today.* 10:296 (1989).
49. Ullman K, Northrop J, Verweij J. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Ann Rev Immunol.* 8:421 (1990).
50. Marcenaro L, Russo C, Kim V, Siskind G, Weksler M. Immunological studies of aging. Normal B-cell repertoire in aged mice: studies at a clonal level. *Cell Immunol.* 119:202 (1989).
51. Pike B, Nossal G. A reappraisal of T-independent antigens. I: Effect of lymphokines on the response of single adult hapten-specific B lymphocytes. *J. Immunol.* 132:1687 (1984).
52. Nossal G, Pike B. A reappraisal of T-independent antigens. II. Studies on a single, hapten-specific B-cells from neonatal CBA/H or CBA/N mice fail to support classification into TI-1 and TI-2 categories. *J Immunol.* 132:1696 (1984).
53. Kelsoe G, Isaak D, Cerny J. Thymic requirement for cyclical idiotypic and reciprocal anti-idiotypic immune responses to a T-independent antigen. *J Exp Med.* 151:289 (1980).

54. Janeway C, Bottomly K, Babich J, Conrad P et Al. Quantitative variation in la antigen expression plays a central role in the immune regulation. *Immunol today*. 5;99 (1984).
55. Quintans J, Cosenza H. Antibody response to phosphorylcholine in vitro. II. Analysis of T-dependent and T-independent responses. *Eur J Immunol*. 6;399 (1976).
56. Zubler R, Glasebrook A. Requirement for three signals in T-independent (lipopolysaccharide-induced) as well as in T-dependent B-cell responses. *J Exp Med*. 155;666 (1982).
57. Pike B, Anderson M and Nossal G. T-independent activation of single B cells: An orderly analysis overlapping stages in the activation pathway. *Immunol Rev*. 99;119 (1987).
58. Renoux G, Biziere K, Renoux M, Gillaumin J. The production of T-cell-inducing factors in mice is controlled by the brain neocortex. *Scan J Immunol*. 17;45 (1983).
59. Gronowicz E, Couthino A, Melchers F. A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur J Immunol*. 6;588 (1976).
60. Roeder D, Lei M-G, Morrison D. Endotoxic-lipopolysaccharide-specific binding proteins on lymphoid cells of various animal species: Association with endotoxin susceptibility. *Infect Immun*. 57;1054 (1989).
61. Metcalf D. Role of mercaptoethanol and endotoxin in stimulating B lymphocyte colony formation in vitro. *J Immunol*. 116;635 (1976).
62. Ratcliffe M, Julius M. H-2 restricted T-B interactions involved in polyspecific B cell responses mediated by soluble antigen. *Eur J Immunol*. 12;634 (1982).
63. Mosier D, Mond J, Goldings E. The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in neonatal mice and mice with an X-linked B cell defect. *J Immunol*. 119;1974 (1977).
64. Gorczynski R, Feldman M. B-cell heterogeneity. Differences in size of B-lymphocytes responding to T-dependent and T-independent antigens. *Cell Immunol*. 18;88 (1975).
65. Yaffe L, Mond J, Ahmed A, Scher I. Analysis of the B-cell subpopulations by allogenic effect factor. I. MHC-restricted enhancement of B-cell responses to thymic-independent antigens. Types 1 and 2 in normal and CBA/N mice. *J Immunol*. 130;632 (1983).

66. Morrissey P, Boswell H, Scher I, Singer A. Role of accessory cells in B cell activation. IV. Accessory cells are required for the *in vitro* generation of thymic independent type 2 antibody responses to polysaccharide antigens. *J Immunol*, 127:1345 (1981).
67. Cronkhite R, Strickland F, Cerny J. Regulation of idiotope expression. III. H-2 influences the magnitude and the idiotype of a T-independent antibody response in mice of certain genetic backgrounds. *J Immunol*, 141:921 (1988).
68. Taylor C, Stashak P, Chiang J, Leiserson W, Caldes G, Prescott B, Baker P. Characteristics of amplifier T-cells involved in the antibody response to the capsular polysaccharide of type III *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*, 132, 3108 (1984).
69. Jerrells T, Marietta C, Eckardt M. Effects of ethanol administration on parameters of immunocompetency in rats. *J Leucocyte Biol*, 39:499 (1986).
70. Anderson J, Mechers F. T cell-dependent activation of resting B-cells: requirements for both non-specific, unrestricted and antigen-specific Ia-restricted soluble factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78:2497 (1981).
71. Singer A, Hodes R. Mechanisms of T cell-B interaction in *Annual Review of Immunology*. Paul WE, Fathman C and Metzger H eds. *Annual Review*, Palo Alto, Calif. pp 211 (1983).
72. Snow E, Noelle R, Uhr J, Vitteta E. Activation of antigen-specific B cells: the role of T cells, cytokines and antigen in the induction of growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:6628 (1983).
73. Kelsoe G. Cloning of mitogen- and antigen-reactive B lymphocytes on filter paper discs: Phenotypic and genotypic analysis of B cell colonies. *Methods in Enzymology*, 150,287 (1987).
74. Rifai A, Lieberman R, Davie J. Clonal nature of the immune response to phosphorylcholine. *J Immunol*, 112;1747 (1974).
75. Cosenza H, Quintans J, Lefkovits I. Antibody response to phosphorylcholine *in vitro*. I. Studies on the frequency of precursor cells, average, clone size and cellular cooperation. *Eur J Immunol*, 5;343 (1975).
76. Lee W, Cosenza H, Koler H. Clonal restriction of the immune response to phosphorylcholine. *Nature*, 247:55 (1974).

77. Anderson H, McCarth H. Preparation of PnC (New modification). *J Exp med.* 93:25 (1951).
78. Cunningham AJ and Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14,559 (1968).
79. Strickland J, Cronkhite R, Cerny J. Regulation of idiotype expression. II. The phenotypic diversity of T 15-idiotype-bearing antibody to phosphorycholine in response to T-dependet an T-indepent antigens. *Immunology.* 67:8 (1989).
- 80 Cronkhite R, Schulze D, Cerny J. Regulation of idiotope expression. Iv. Genetic linkage of two D region-depende T 15-idiotopes to Igh allotype. *J Immunol.* 142,568 (1989).
- 81 Jerrells T, Marietta C, Weight F. Effect of adrenalectomy on ethanol-associated immunosuppression. *Int J Immunopharmacol.* 12,435 (1990).
- 82 Saad J, Wirt D, Jerrells T. Ethanol-induced changes in the spleen and thymus: A flow cytometric and immunohistochemical study. *Alcohol Clin Exp. Res.* In pres (1991).