



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O. D

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CCR5 EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS DE ADULTOS JOVENES CON CONSUMO DE ALCOHOL EN FIN DE SEMANA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
*ESPECIALISTA EN MEDICINA DE URGENCIAS*

*P R E S E N T A N*

**DR. HELBERT FERNANDO RODRIGUEZ FRANCO**

Residente de Tercer Año  
Urgencias Médico–Quirúrgicas

**DR. HUMBERTO FEDERICO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**  
Director de Tesis

**DR. GABRIELA ELAINE GUTIÉRREZ UVALLE**

Profesor Titular y Asesor de Tesis

México, D. F. Julio de 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## SERVICIO DE URGENCIAS MÉDICO–QUIRÚRGICAS

### T E S I S

# Análisis de expresión de ccr5 en linfocitos periféricos de adultos jóvenes con consumo de alcohol en fin de semana

---

**Dr. Helbert Fernando Rodriguez Franco**

Residente Tercer Año  
Urgencias Médico–Quirúrgicas  
Hospital General de México

---

**Dra. Gabriela E. Gutiérrez Uvalle**

Jefe del Servicio de Urgencias  
Hospital General de México

---

**Dr. Humberto Hernández Martínez**

Profesor adjunto del curso de post  
grado Medicina de Urgencias

## INDICE

Firmas autorizadas.....	2
Índice de figuras y tablas.....	5
Agradecimientos.....	8
Glosario .....	9
Resumen.....	12
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	17
2.1 Metabolismo del alcohol y relación con el sistema inmune.....	17
2.2 Sistema inmunológico y daño hepático.....	20
2.3 Metabolismo del alcohol y su relación con el sistema inmune.....	23
3. Planteamiento del problema.....	28
4. Justificación.....	29
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivos.....	30
6.1 Objetivos Generales.....	30
6.2 Objetivos Particulares.....	31
7. Material y Métodos.....	31
7.1 Tipo de diseño y de estudio.....	33
7.2 población y tamaño de la muestra.....	33
7.3 Criterios.....	34
7.3.1 Criterios de Inclusión.....	34
7.3.2 Criterios de Exclusión.....	35
7.3.3 Criterios de Eliminación.....	35

<b>8. Procedimiento.....</b>	<b>36</b>
<b>8.1 Análisis estadístico.....</b>	<b>36</b>
<b>8.2 Aspectos técnicos y de bioseguridad.....</b>	<b>36</b>
<b>9. Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>10. Discusión.....</b>	<b>43</b>
<b>11. Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>45</b>
<b>13. Anexos.....</b>	<b>57</b>
<b>13.1 Anexo 1.....</b>	<b>58</b>
<b>13.2 Anexo 2.....</b>	<b>59</b>
<b>13.3 Anexo 3.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Riesgo relativo de mortalidad.....	22
<b>Figura 2:</b> Metabolismo del alcohol.....	23
<b>Figura 3:</b> Afección del alcohol a la respuesta inmune.....	25
<b>Figura 4:</b> Activación del complemento y su contribución a la patogénesis en la enfermedad hepática alcohólica.....	27
<b>Figura 5:</b> Múltiples efectos del consumo consuetudinario en el hígado.....	28
<b>Figura 6:</b> Grupo de consumo de acuerdo a número de copas y genero.....	37
<b>Figura 7:</b> Citometria de flujo para Polimorfonucleares.....	38
<b>Figura 8:</b> Citometria de flujo Linfocitos CD3 y expresión CCR5.....	39
<b>Figura 9:</b> Expresión de CCR5 en linfocitos periféricos.....	42
<b>Figura 10:</b> Expresión de CCR5 en los linfocitos T CD3 brigh.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1:</b> Distribución por edad y grupo.....	37
<b>Tabla 2:</b> Distribución por sexo y grupo.....	37
<b>Tabla 3:</b> Prueba de muestras independientes T de student.....	40
<b>Tabla 4:</b> Estadística de grupo.....	41

**Análisis de expresión de ccr5 en linfocitos periféricos de adultos jóvenes  
con consumo de alcohol en fin de semana.**

Hospital General de México, Servicio de Urgencias Médico–Quirúrgicas.

**Financiamiento:** Recursos ya destinados para la realización del protocolo de investigación en el laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad Intestinal (HIPAM) localizado en la Unidad de Medicina Experimental de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicada dentro del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Esta tesis esta derivada del protocolo registró D1/03/12/045 autorizado por la dirección de investigación del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (Anexo 1).

**Investigadores:**

- Dr. Humberto Hernández Martínez, Médico Urgenciólogo e Intensivista adscrito al Servicio de Urgencias del Hospital General de México.  
RFC. HEMH780227  
Email. Humberto\_hernandez@hotmail.com  
Tel. 5538988353
- Helbert Fernando Rodriguez Franco, Residente de Tercer Año de Urgencias Médico Quirúrgicas, Hospital General de México.  
CURP. ROFH800524HNEDRL02  
Email. hrf\_doc@hotmail.com  
Tel. 5550539062

**Jefe de Servicio Urgencias Médico Quirúrgicas:** Dra. Gabriela Elaine Gutiérrez Uvalle

**Inicio Protocolo:** marzo 2015

**Terminación Protocolo:** julio 2015



## AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad Intestinal (HIPAM) por el uso de sus instalaciones, sin las cuales no se hubiera podido llevar a cabo esta investigación.

Agradezco enormemente a mi director de tesis, el Dr. Humberto Hernández Martínez por su apoyo y colaboración, a la Dra. Gabriela Elaine Gutiérrez Uvalle profesora titular del curso, asesora de este trabajo y la cual me ayudo en la realización de esta tesis y en reconocimiento especial al Dr. Joselin Hernández Ruiz quien gracias a su paciencia y ayuda, que me fortaleció para terminar este trabajo.

A mi familia por su alegría, participación y apoyo constante a lo largo de todo este proceso de formación, sin el cual el camino se habría vuelto más difícil e imposible de finalizar en buen término.

Al Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" por ayudarme en mi formación profesional de forma desinteresada y permitirme la oportunidad de superarme en mi pos grado, así como a la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como alumno, siendo un honor recibir un título de especialista de tan importante y reconocida institución académica.

A todos mis compañeros de residencia y de otras especialidades por su invaluable apoyo en este proyecto profesional al cual me dedique por completo.

A todos muchas gracias.

## GLOSARIO

**BIFIS:** Bebedores intensos de fin de semana

**CD:** (*clúster of differentiation*) Los CD son moléculas marcadoras en la superficie celular, que reconocen ciertos anticuerpos, usadas para la identificación del tipo de celular, estadio de la diferenciación celular y actividad de la misma. Son un sistema de antígenos de superficie celular de los leucocitos humanos, caracterizados por anticuerpos monoclonales.

**CD69:** marcador expresado por células T, asociado a complejo receptor T/CD3. Una vez que se expresa, actúa como molécula coestimuladora de la activación y proliferación de células T. además su expresión es inducida por timocitos inmaduros, células B, NK, monocitos, neutrófilos y eosinófilos, y es expresado en plaquetas y timocitos maduros.

**CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS (MAPK)** es una ruta de transducción de señal de células de eucariotas que se sitúa corriente abajo de receptores tirosín cinasas así como la mayoría de receptores para citosina.

**INDICE MEDIO DE FLUORESCENCIA (IMF):** Es utilizada en citometria de flujo para identificar diferentes receptores en las células estudiadas, marcando estas células con anticuerpos específicos conjugados a un fluorescente

**INTERLEUCINAS:** son un conjunto de citocinas (proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia) que son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algún caso también pueden intervenir células endoteliales o del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos.

**LINFOCITOS** Los linfocitos son un tipo de leucocito (glóbulo blanco) de menor tamaño (entre 7 y 15  $\mu\text{m}$ ) y representan del 24 a 32% del total en la sangre periférica

**NEUTROFILOS:** también denominados leucocitos polimorfonucleares, forman la población más abundante de leucocitos circulantes e intervienen en las primeras fases de las respuestas inflamatorias.

**POLIMORFONUCLEARES.** Son leucocitos que presentan un núcleo lobulado y que contienen en su citoplasma gránulos específicos. Existen tres tipos: neutrófilos, eosinofilos y basófilos. En sangre periférica, más del 90% son neutrófilos.

**QUIMIOCINA:** Las quimiocinas (también denominadas quimioquinas) son proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a una familia de las citoquinas. Se llaman de este modo debido a la capacidad que tienen para inducir la quimiotaxis en las inmediaciones de las células sensibles, son citoquinas quimiotácticas. El papel más importante que desempeñan las quimiocinas es el de actuar como un quimioatrayente para guiar la migración celular. Los miembros de la familia de las quimiocinas se dividen en cuatro grupos dependiendo de la distancia entre sus dos primeros residuos de cisteína. La nomenclatura de las quimiocinas es, por ejemplo: CCL1 para el primer ligando de la familia CC de las quimiocinas y CCR1 para su receptor respectivo.

**RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)** son una familia de proteínas trans-membranales de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato

**RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.** Los receptores de quimiocina están acoplados a receptores de proteínas G con siete dominios trans-membrana que se encuentran en la superficie de los leucocitos. Existen 4 familias dependiendo del tipo de quimiocina al que se unen; los receptores CXCR se unen a quimiocinas CXC, los CRC se unen a quimiocinas CC, los CX3CR1 se unen a la única quimiocina CXC3 y el receptor XCR1 se une a las dos quimiocinas XC (XCL1, XCL2).

**TGF-beta:** citosina de 25 kD, originada en los linfocitos T, macrófagos y otros tipos celulares.

## RESUMEN

El alcoholismo es un problema sanitario de orden mundial. En nuestro país, los jóvenes entre 18 y 29 años son los mayores consumidores de alcohol y se caracterizan por ser bebedores de fin de semana. El consumo fuerte y discontinuo de alcohol en jóvenes, o de fin de semana, puede ser más dañino para el sistema inmune que la ingesta continua de cantidades moderadas. El sistema inmune es un componente que se modifica por el consumo de alcohol y puede condicionar el daño hepático. El daño hepático por alcohol se caracteriza por un infiltrado de neutrófilos, sin embargo no se conoce si los linfocitos periféricos con expresión de CCR5 se encuentran en mayor activación en los de consumo fuerte en comparación con los de moderado y esto repercute en daño hepático.

**Objetivo general.** Estudiar la repercusión del patrón de consumo de alcohol en el direccionamiento y activación temprana de CCR5 en los linfocitos periféricos de jóvenes con consumo de alcohol de fin de semana

**Material y métodos. Grupo 1:** 16 jóvenes con consumo discontinuo de 50 a 79 gr de alcohol en hombres y 30 a 49 gr de alcohol en mujeres, por ocasión. **Grupo 2:** 16 jóvenes con consumo discontinuo 49gr a 20gr de alcohol en hombres y 29 a 10 gr en mujeres, por ocasión. **Grupo 3:** 16 jóvenes con consumo de 19 a 0gr de alcohol en hombres y de 9 a 0 gr de alcohol en mujeres, por ocasión. Todos los grupos entre 18-29 años de edad y sin hepatitis viral. Los participantes fueron familiares de pacientes del Hospital General de México, en reclutamiento abierto. Se les realizó somatometría, se aplicaron las pruebas AUDIT y Encuesta de Patrón

de Consumo de Alcohol HEPCA. Se obtuvieron 30 ml de sangre periférica, con la cual se evaluó biometría hemática (BH), química sanguínea (QS), tiempo de protrombina (TP), pruebas de funcionamiento hepático (PFH), perfil de lípidos y panel viral para hepatitis B y C, además de fenotipificación y perfil fenotípico de células polimorfonucleares (expresión de CD69, CXCR4, CCR4 y CCR5) por citometría de flujo y de linfocitos expresión CD3, CCR5 por misma técnica.

**Resultados:** Se encontró que en el grupo de los los BIFIS tienen menos CCR5 en sus linfocitos periféricos (Bifis 286.23 IMF +/- 178.02 vs Moderados 476.3571 IMF +/- 206.97;  $p=0.01$ ) pero más CCR5 en los linfocitos T que poseen CCR5 en gran cantidad (Bifis 12771.87 IMF +/- 1881.6 vs Moderados 11310.28 IMF +/- 1395.7;  $p=0.02$ ).

**Conclusiones:** El patrón de consumo tiene una afeción directa en el sistema inmune al verse reflejado al presentarse diferencias estadísticamente significativas en el grupo BIFIS en relación con el grupo moderado: los linfocitos periféricos del grupo BIFIS presento menor expresión de CCR5 con una alta posibilidad de que estos se infiltren al hígado generando daño hepático y con linfocitos TCD3 con expresión de CCR5 que se sobrepresan mas en los adultos jóvenes de consumo moderado como posible factor protector del daño hepático.

**PALABRAS CLAVE;** alcohol, jóvenes, sistema inmune, linfocitos, quimiocinas.

## 1. INTRODUCCION

El alcoholismo crónico es un problema sanitario de primer orden en el mundo occidental y condiciona un elevado gasto tanto en la problemática social como en la sanitaria. Un gran número de variables genéticas, biológicas, psicológicas, inmunológicas y socioculturales han mostrado relación con esta enfermedad, sin embargo no se ha aclarado totalmente su patogenia, por lo tanto no existen adecuadas estrategias diagnósticas y de tratamiento. En nuestro país el grupo de edad que muestra los niveles más altos de consumo va de 18 a 29 años (ENA, 2008). El Distrito Federal es una de las zonas con mayor índice de consumo de alcohol y con mayor presencia de abuso y dependencia en mujeres. Esto resalta cuando se observa el aumento del consumo entre las mujeres adolescentes (ENA, 2008).

El abuso crónico del alcohol (> 80g/día en hombres, > 50g/día en mujeres en los últimos 5 años) tiene un efecto adverso sobre diferentes órganos. Está bien descrito el desarrollo de miocardiopatía, hepatopatía, pancreatitis, lesiones en el sistema nervioso central, neuropatía periférica y miopatía esquelética en pacientes alcohólicos crónicos (Soyca et al, 2008). Diversos estudios clínicos también han relacionado el alcoholismo crónico con mayor prevalencia de enfermedades infecciosas, especialmente, infecciones del árbol respiratorio y tracto digestivo superior (Singal & Anand, 2007; Toth et al, 2004; Wilson & Saukkonen, 2004, Nelson & Kolls, 2002). Por otra parte estudios recientes en animales y humanos han

demostrado que el consumo de alcohol tiene efectos nocivos en los sistemas inato y adquirido de la inmunidad. El daño de las respuestas inmunes adquiridas como disfunción de los linfocitos B, alteración en el balance de citosinas y la activación crónica de las células T puede acelerar la progresión de cualquier enfermedad, incluido el HIV. Además, el alcohol puede jugar un papel importante en la translocación de bacterias y productos bacterianos en el intestino para causar la activación inmune del HIV, lo que resulta en una mayor progresión de la enfermedad (Hahn & Samet, 2010)

La adolescencia es la edad en que más frecuentemente se produce el inicio del uso, abuso y la dependencia a sustancias (Compton, W., Thomas, Y., Conway, K., et al, 2005). Una vez iniciado el consumo, y a veces sin pasar por un abuso, los adolescentes pueden escalar una rápida progresión a la dependencia (Clark, D, 2004, Winters, K., 1999,). Más aún, el síndrome de dependencia a sustancias posee características clínicas diferentes entre adolescentes y adultos. Estudios que investigan el abuso y la dependencia al alcohol en grandes muestras de población adolescente han evidenciado que:

- El síndrome de abstinencia a alcohol es raro.
- La tolerancia tiene baja especificidad para el diagnóstico de la dependencia.
- Los problemas de salud físicos no son tan frecuentes como en los adultos dependientes al alcohol.



- El abandono de las actividades habituales por utilizar alcohol puede no estar presente en adolescentes dependientes (Clark, D, 2004, Fulkerson, J. A., Harrison, P. A., and Beebe, T. J.1999).

Por lo anterior, no es posible estudiar el consumo fuerte de alcohol en jóvenes con las herramientas dispuestas para adultos. Es necesario desarrollar herramientas ad hoc para establecer puntos de corte entre consumo moderado y excesivo, así como diseñar marcadores biológicos de cambio inducido por el alcohol que condicionen al daño hepático.

## **2. ANTECEDENTES**

El alcohol es probablemente la droga más antigua que se tiene registrada, su uso y abuso se ha documentado a través de la historia desde hace aproximadamente 7000 años A.C. así como sus consecuencias y advertencias en la literatura antigua (McGovern, et all, 2004).

### **2.1 Metabolismo del alcohol y relación con el sistema inmune.**

El hígado es el principal sitio donde se metaboliza el etanol en el cuerpo, y un amplio rango de alteraciones metabólicas se han asociado con la ingesta de alcohol excesiva y crónica. Como resultado el hígado está expuesto a hipoxia transitoria, episodios de estrés oxidativo y a los productos del metabolismo del etanol, tales como el acetaldehído, acetato, y esteres etil de ácidos grasos. Además el consumo crónico del etanol es asociado con la alteración de la respuesta inflamatoria inducida por estrés oxidativo que contribuye a los cambios en la actividad de las células inflamatorias (Pranoti, 2008); los niveles aumentados de endotoxinas circulantes por la translocación del estómago a la circulación portal estimulan la secreción de citocinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 beta, e IL-6 que afectan la función hepática. Las células de Kupffer son la principal fuente de citocinas proinflamatorias y quimiocinas circulantes a través de múltiples mecanismos (Vidali, 2008). Las proteínas de choque térmico (HSPs) y el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1) son inducidos por estrés oxidativo regulado por la activación de NF $\kappa$ B y la expresión de TNF- $\alpha$  en monocitos y macrófagos (Mandrekar, 2008). Se han encontrado

infiltrados inflamatorios que contienen linfocitos T CD8+ y CD4+ en áreas portales y periportales en cerca del 40% de los pacientes con enfermedad hepática alcohólica (ALD) avanzada y correlacionan con el grado de inflamación intralobular, necrosis y fibrosis septal (Vidali, 2008).

Además, los hepatocitos son más susceptibles a desafíos pro-apoptóticos y a acciones citotóxicas del TNF- $\alpha$  y otras citocinas y quimiocinas. Los mecanismos por los cuales los hepatocitos tienen mayor sensibilidad después de un tratamiento crónico de etanol son poco conocidos, pero puede involucrar defectos en la función mitocondrial y en los mecanismos de defensa oxidativos, en la activación de rutas de señalización que promueven la muerte y la inactivación de vías de sobrevivencia (Hoek JB, 2002, Hoek JB, 2004). Varias rutas de señalización que han sido implicadas en regular la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, disparan la fibrogénesis y la cicatrización a través de la activación de factores de transcripción y proteína de activación 1 (AP-1). El persistente abuso del alcohol, la progresión del daño a través de regeneración tisular deteriorada, producción de citocinas, infiltración de leucocitos y recambio de matriz extracelular (MEC) y fibrogénesis, conducen a la cirrosis (Gressner and Bachem, 1990).

Aún se desconoce el mecanismo por el cual el alcohol afecta el componente inmune. Desde el siglo pasado se sabe que el alcohol etílico tiene un efecto directo sobre la liposolubilidad de las membranas celulares (Wood et al, 1989). La exposición aguda al etanol aumenta la fluidez de las membranas biológicas mientras

que la exposición crónica disminuye la fluidez de las mismas (Doyle et al, 1990). Sin embargo, el efecto sistémico es algo distinto, ya que existe un fenómeno de tolerancia en las membranas celulares de muchos tejidos de modo que los animales alcoholizados son más resistentes a la acción del etanol sobre las membranas. Este fenómeno de tolerancia al alcohol se debe principalmente al cambio en la composición de fosfolípidos (cardiolipina, fosfatidil inositol) y al incremento del colesterol en las membranas celulares (Stubbs et al, 1988). Estos cambios en la fluidez de la membrana plasmática modifica el flujo de moléculas entre el medio extracelular y el citoplasma (Fanó et al, 1993), lo cual puede interferir en procesos inmunológicos como fagocitosis, degranulación, citotoxicidad y liberación de mensajeros de la respuesta inmune. Recientemente se considera que el efecto del alcohol es mediado por alteraciones sobre proteínas particulares que interactúan con el alcohol, como la alcohol deshidrogenasa, la adenil ciclasa y algunos canales iónicos dependientes de ligando (Harris et al, 2009). Adicionalmente se ha sugerido que los subproductos del alcohol como productos de proteínas y productos de peroxidación lipídica, inducen en parte la inflamación en el hígado que se presenta en la enfermedad hepática por alcohol (Vidali et al, 2008). Por último, se ha señalado que el alcohol puede modular la vía de señalización de los receptores tipo “Toll” (TLR) en particular el TLR4 (Pascual et al, 2011), el cual reconoce endotoxinas; por tanto, los TLRs pueden jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad hepática por alcohol.

## 2.2 Sistema inmunológico y daño hepático

A nivel sistémico, se ha demostrado tanto en humanos como en ratones que el consumo crónico de alcohol reduce la cantidad de células NK periféricas y genera desbalance entre las subpoblaciones linfocitarias, provocando baja actividad citotóxica y predisposición a infecciones (Szabo 1999; Zhang & Meadows, 2008). Además, se reportó recientemente en un modelo murino, que el consumo discontinuo induce cambios en parámetros inmunológicos como la cantidad de células CD8 y B, de manera más fuerte que con consumo continuo (Jiménez-Ortega et al, 2010).

Se desconoce la razón de este desbalance pero se sugiere que puede suceder por disminución en la generación de timocitos (Cook et al, 2007) y/o por apoptosis de los linfocitos (Alhomsy et al, 2008). Esta modificación en las subpoblaciones de linfocitos no solo es importante a nivel de la defensa inmune, también puede tener un efecto sobre el hígado (Arteel G, 2008). Se ha observado que el alcoholismo acelera la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis viral, lo cual no es completamente explicado por el incremento en el daño hepático (Jeong et al, 2008). El alcohol puede acelerar la progresión de la fibrosis hepática por muchos mecanismos, es capaz de activar las células estelares hepáticas (HSC) al incrementar la entrada de endotoxinas derivadas del tracto digestivo, el estrés oxidativo y la formación de metabolitos tóxicos y profibrogénicos, como el acetaldehído y peróxidos lipídicos (Purohit & Brenner, 2006; Siegmund et al, 2005; Friedman, 1999).

Se ha observado que la activación del sistema inmune innato inhibe la fibrosis hepática (Radaeva et al, 2006), en particular, se sabe que las células NK son capaces de detectar e inducir apoptosis en las HSC activadas. Recientemente se pudo demostrar que el consumo crónico de etanol atenúa los efectos antifibróticos de las células NK en el hígado (Jeong et al, 2008), con lo cual se explica la participación del etanol en la aceleración de la fibrosis hepática.

Los neutrófilos se acumulan en las sinusoides hepáticas en respuesta a las citocinas y quimiocinas liberadas por las células de Kupffer, los hepatocitos y las células estelares que a su vez responden a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o estimulación por endotoxinas. Estudios en pacientes con hepatitis alcohólica muestran que los neutrófilos tienen una activación más alta que en los pacientes con cirrosis o en sujetos sanos, y que este incremento depende de endotoxinas.

La migración de los neutrófilos en los sinusoides a través del endotelio es esencial para el desarrollo de inflamación hepática inducida por alcohol, para la adhesión del neutrófilo al endotelio, tienen que interactuar la integrina CD-11b/CD18 (en la superficie del neutrófilo) con la molécula de adhesión ICAM-1 (en la superficie del endotelio). Esta idea está sustentada por un estudio que muestra que la deficiencia de ICAM-1 reduce de manera significativa el daño hepático y la infiltración de neutrófilos en un modelo de ratón con consumo continuo de alcohol.

Una vez que los neutrófilos se encuentran en el parénquima hepático, presentan una activación por la vía de las citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo cual potencia la inflamación hepática a través del reclutamiento de otras células inflamatorias: neutrófilos, linfocitos y monocitos, sin embargo la producción de

especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas liberadas, son los mecanismos principales de daño hepático inducido por los neutrófilos. (Duddempudi, 2012).

Sin embargo, el consumo de alcohol también tiene efectos benéficos en ciertas enfermedades, principalmente en cardiopatía isquémica, se ha visto que a bajos consumos (dos copas en hombres, o una copa en mujeres) tiene un efecto benéfico en la enfermedad coronaria, así como también reduciendo la mortalidad general y el riesgo de mortalidad relativa (Nelson, et all, 2002) (Fig. 1).

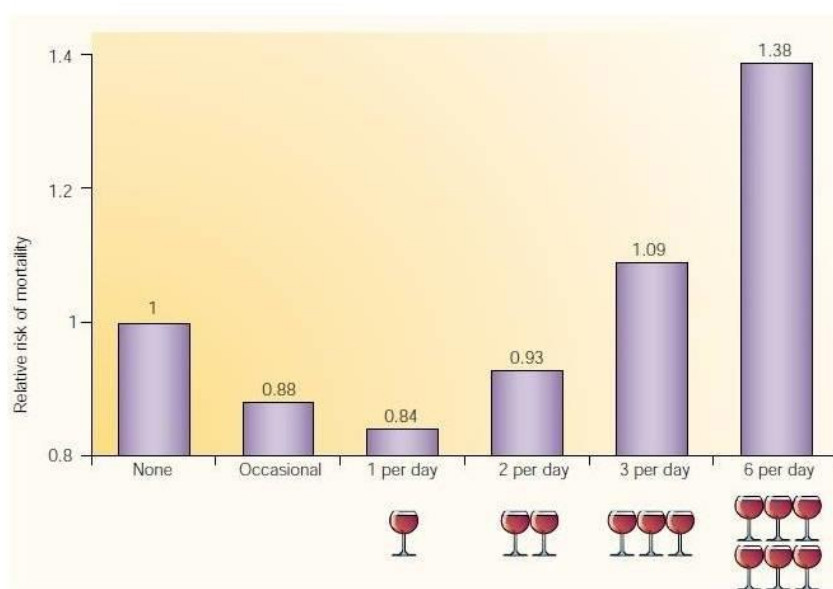


Fig. 1 Riesgo Relativo de Mortalidad.

El consumo moderado de alcohol se ha asociado a una disminución en el riesgo relativo de mortalidad, mientras que el consumo de tres o más copas por día se ha asociado con un incremento en las causas de mortalidad.

Tomado de: Nat Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):205-9.

Los mecanismos que soportan esta asociación benéfica a nivel cardiovascular se deben a un aumento en las lipoproteínas de alta densidad y de la fibrinólisis, disminución de la agregación plaquetaria y de los factores de coagulación (Rimm, et all, 1999), así como también un efecto benéfico en la función endotelial y en la

inflamación (Estruch, et al, 2004), el consumo de vino durante las comidas se ha asociado con un mecanismo preventivo de lesión ateromatosa (Ursini, 2002).

### 2.3 METABOLISMO DEL ALCOHOL Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE

El metabolismo del alcohol en hombres y mujeres varía, tanto por la cantidad de agua corporal, la grasa corporal, la presencia de estrógenos (Li TK, et al, 2008), los niveles de actividad de la alcohol deshidrogenasa gástrica son más bajos en las mujeres, lo cual ocasiona, niveles de alcohol en la sangre mayores y con ello mayor riesgo de enfermedades hepáticas (Ely M, et al, 1999).

El alcohol se metaboliza por las enzimas: aldehído deshidrogenasa (ALDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), citocromo p450 (CYP2E1) y la catalasa<sup>30</sup> (Fig. 2). La mayor parte del metabolismo del alcohol se lleva a cabo en el hígado involucrando la enzima alcohol deshidrogenasa (Li TK, et al, 2008).

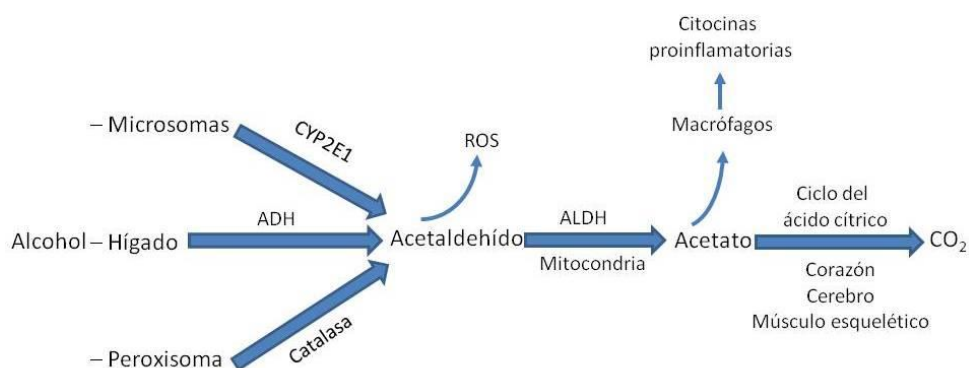


Fig. 2 Metabolismo del Alcohol

En el hepatocito, el alcohol es metabolizado inicialmente en acetaldehído, por la alcohol deshidrogenasa en el citosol, en los microsomas por el citocromo p450 y en los peroxisomas por la catalasa. El metabolismo del etanol genera especies reactivas de oxígeno (ROS). El acetaldehído es metabolizado por la aldehído deshidrogenasa en acetato en la mitocondria. Por último el acetato entra a la circulación y por medio del ciclo del ácido cítrico se transforma en CO<sub>2</sub> en corazón, cerebro y músculo esquelético, en pacientes con hepatitis alcohólica el acetato estimula los macrófagos generando la liberación de citocinas proinflamatorias.

Adaptado de: Gastroenterology. 2011 Nov;141(5):1572-85.



Debido al rápido metabolismo del acetaldehído sus concentraciones a nivel celular tienden a ser hasta mil veces menores que el alcohol o acetato, sin embargo, cuando estos niveles aumentan un individuo puede experimentar sensaciones disforicas (Li TK, et all, 2008); a nivel hepático, el acetaldehído es tóxico para los hepatocitos formando una variedad de aductos de proteína de DNA, que promueven la depleción de glutatión, peroxidación lipídica, daño mitocondrial y pueden funcionar como neoantígenos desencadenando así un proceso autoinmune a nivel hepático (Nelson, 2002) (Setshedi, et all, 2010) (Farfan Labonne, et all, 2009).

El metabolismo de grandes cantidades de alcohol y acetaldehído por la vía de ADH y ALDH llevan a una elevación en el índice NADH/NAD<sup>+</sup> a nivel hepático provocando una disrupción mitocondrial en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos ocasionando complicaciones como esteatohepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Li TK, et all, 2008).

La oxidación del alcohol hacia acetaldehído mediante el mecanismo microsomal de CYP2E1 y la reoxidación de NADH hacia NAD<sup>+</sup> por la cadena transportadora de electrones genera especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual posteriormente puede desencadenar una respuesta inflamatoria, apoptosis y muerte celular en diferentes órganos como hígado, pulmón, corazón y cerebro.

El acetaldehído por sí mismo junto con la peroxidación de lípidos puede producir una respuesta autoinmune dañina que promueva la carcinogénesis (Li TK, et all,

2008), en individuos con alcoholismo crónico se ha establecido la presencia de procesos autoinmunes a través de la detección de autoanticuerpos para linfocitos, cerebro, DNA, lipoproteínas séricas, y varias proteínas hepáticas (Vidali, et all, 2008).

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que el alcohol es un potente agente inmunomodulador. Aún el consumo de alcohol en una única ocasión en cantidades superiores a las recomendables, ocasiona alteraciones en la respuesta inmune innata como atenuación o alteraciones en la función celular contra patógenos (Szabo, 2009) (Fig. 3).

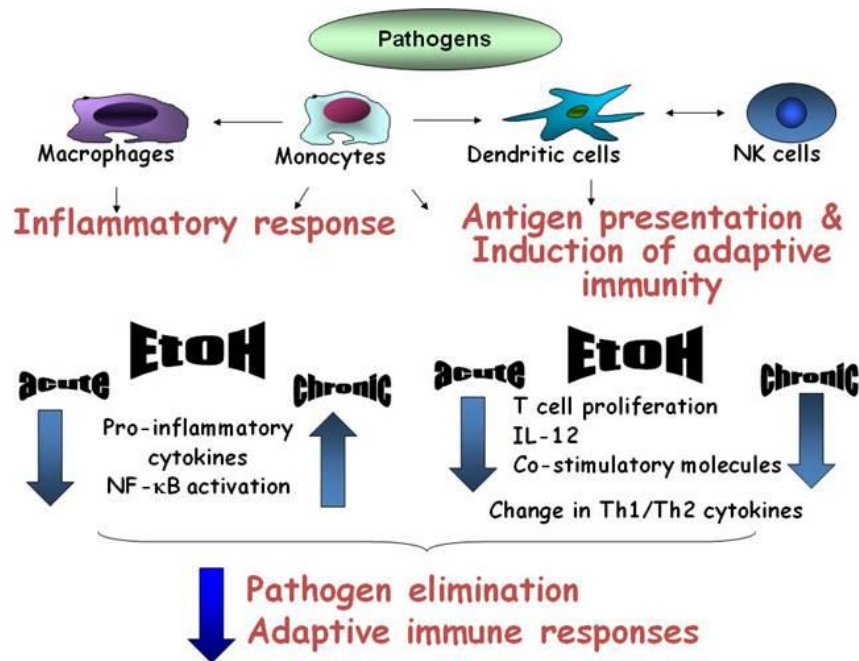


Fig 3. Afección del alcohol a la respuesta inmune

El consumo de alcohol agudo y crónico, tiene un efecto inmunoregulador. Las células del sistema inmune innato (macrófagos, monocitos, células dendríticas y células NK) son moduladas por el alcohol en su capacidad para responder a patógenos. La respuesta inflamatoria se basa en la producción de citocinas IL-1 y TNF $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ B es inhibido por el consumo agudo, mientras que el consumo crónico aumenta esta respuesta inflamatoria. La presentación de antígenos por monocitos y células dendríticas es deficiente tanto en el consumo agudo como en el consumo crónico, también se ven alteradas la producción de citocinas en la respuesta Th1 (IFN $\gamma$ ) y Th2 (IL-10). Las anomalías producidas por el alcohol favorecen una inmunidad adaptativa deficiente, y una dificultad para la eliminación de patógenos

Tomado de: Alcohol Clin Exp Res. 2009 Feb;33(2):220-32.

La activación del componente innato inicia la lesión hepática alcohólica así como mecanismos hepatoprotectores y regenerativos, respuesta antiinflamatoria que reduce el daño hepatocelular inducido por alcohol (Gao B, 2011). La función de presentación de antígenos por parte de la inmunidad innata (monocitos y macrófagos) se inhibe ante la exposición al alcohol y esta alteración contribuye a una disminución en la proliferación de células T antígeno-específicas. La función de las células T se afecta también por un cambio en la distribución y funcionamiento de las células T de memoria. La función de las células NK también sufre una alteración, sin embargo, la función de las células B parecen no sufrir alteraciones (Szabo, 2009).

El consumo de alcohol ocasiona una disbiosis entérica, sobrecrecimiento bacteriano y un aumento en la permeabilidad intestinal, lo que ocasiona translocación de LPS derivado de bacterias (Yan AW, 2011) y su presencia en el tracto portal (Szabo, 2009), activa las proteínas del complemento C3 y C5 resultando en una activación de las células de Kupffer, iniciando la respuesta inflamatoria con producción de citocinas (Fig. 4) y quimiocinas que activen la respuesta inmune innata y esto lleve a un daño hepático (Szabo, 2009) (Pritchard, 2007). De forma opuesta la activación de TLR4 (por unión al LPS) y del complemento, provoca la secreción de citocinas hepatoprotectoras (IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) (Mandal P, 2010) (Horiguchi, et al, 2008).

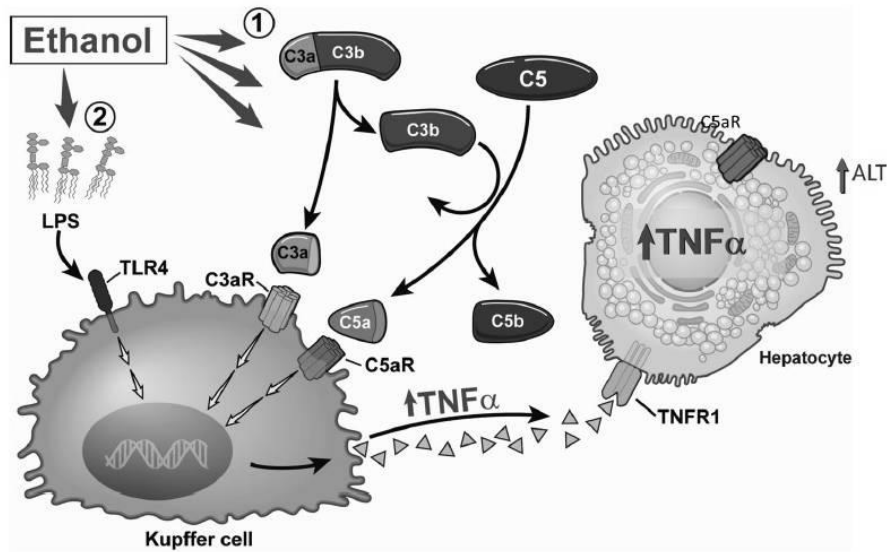


Fig. 4 Activación del complemento y su contribución a la patogénesis en la enfermedad hepática alcohólica

1. El consumo de alcohol ocasiona una activación del complemento (C3 y C5), el complemento activado, interactúa con las células de Kupffer ocasionando producción de  $TNF\alpha$  el cual induce daño hepático.
2. El consumo de alcohol crónico activa la vía a través del complemento como la vía a través del TLR4, ambos contribuyen a la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica.

Tomado de: *Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Apr;300(4):G516-25.

En pacientes con consumo elevado de alcohol, hay múltiples factores que estimulan a las células del parénquima para producir citocinas y quimiocinas, lo cual induce el reclutamiento de neutrofilos, que infiltran el hígado y contribuyen al daño hepático por alcohol (Gao B, et al, 2011). Por otro lado los efectos del consumo tipo consuetudinario en el hígado son a diferentes niveles: modulación inmunológica, metabólica, vías de señalización, mecanismos epigenéticos, etc (Shukla, et al, 2013) (Fig. 5).



Fig. 5 Múltiples efectos del consumo Binge en el hígado

Adaptado de: Alcohol Clin Exp Res. 2013 Apr;37(4):550-7.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo discontinuo de alcohol en jóvenes, puede ser más dañino para el sistema inmune que la ingesta continua de cantidades moderadas. Además, se sabe que el componente inmune participa activamente en el daño hepático y en el proceso fibrogénico. La información disponible se ha extraído principalmente de modelos animales, por lo tanto es necesario evaluar si tales modificaciones se observan en humanos y si tienen relación con el daño hepático.

Dentro del daño hepático inducido por alcohol, los neutrófilos juegan un papel importante ya que con gran frecuencia se presentan en el infiltrado hepático. (Dhanda AD, 2012) Estas células dependen de receptores de moléculas quimiotácticas para llegar hasta un tejido inflamado. Estudios en pacientes con hepatitis alcohólica han mostrado un incremento significativo en su estado de activación comparado con pacientes con cirrosis o sujetos sano.

En estudios *in vitro* de cortes de hígado humanos desafiados con cantidades de etanol equivalentes a los de consumo fuerte de alcohol mostraron que los linfocitos

sobre expresan el receptor de quimiocinas CXCR4 y se infiltraron en el tejido hepático (Karim S et al, 2013). Otros receptores de quimiocinas tales como CCR5 (Moreno C et al, 2005) también han sido implicados en la inflamación del hígado y su infiltración. Por otro lado, la activación de linfocitos periféricos se encontró en alcohólicos crónicos y se correlaciono con la dosis total de etanol consumido toda la vida (Scanella E et al, 1998).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El consumo de alcohol en jóvenes entre 18 a 29 años es un problema de salud pública que incide tanto en tema social como en el de salud. A nivel de comunicación se menciona que el consumo excesivo es perjudicial para la salud y que el alcohol se debe tomar con moderación, sin embargo no es clara la diferencia entre consumo moderado y excesivo, más para la población joven.

La mayoría de estudios en humanos se han realizado en poblaciones entre 30 y 60 años de edad y consumidores crónicos. En población joven, el consumo prevalente es episódico o discontinuo (más de cinco tragos en una sola ocasión, principalmente en fin de semana) (Paho, 2007). Además se ha descrito que el componente inmune participa activamente en el daño hepático y en el proceso fibrogénico, sin embargo, la mayor parte de la evidencia a este respecto proviene de modelos *in vitro* y modelos animales, por lo que es necesario el estudio de dichos procesos en humanos.

Por lo anterior este proyecto pretende estudiar si en jóvenes consumidores de alcohol, la expresión de CCR5 en los linfocitos periféricos se encuentra en mayor activación y direccionamiento comparando los consumidores fuertes (BIFIS) y los moderados, y si esto se asocia con el daño hepático. El presente proyecto podría contribuir al conocimiento de los mecanismos que participan en esta patología y a la búsqueda de nuevas y adecuadas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

## **5. HIPÓTESIS**

SI EL PATRÓN DEL CONSUMO DE ALCOHOL (CANTIDAD Y FRECUENCIA) SE RELACIONAN CON MAYOR EXPRESION DE CCR5 EN LOS LINFOCITOS PERIFERICOS DE LOS JOVENES CON CONSUMO FUERTE DE ALCOHOL DE FIN DE SEMANA Y DESARROLLAR DAÑO HEPATICO TEMPRANO.

## **6. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES**

### **6.1 Objetivo general**

Estudiar la repercusión del patrón de consumo de alcohol en el direccionamiento y activación temprana de CCR5 en los linfocitos periféricos de jóvenes con consumo de alcohol de fin de semana.

## 6.2 Objetivos particulares:

1. Determinar el patrón de consumo de alcohol de jóvenes consumidores de bebidas alcohólicas.
2. Determinar el direccionamiento y activación temprana de linfocitos TCD3 periféricos así como el daño hepático de jóvenes consumidores de bebidas alcohólicas.

## 7. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

Se elaboró en cada paciente una historia clínica detallada de acuerdo al modelo diseñado con anterioridad para la atención del paciente alcohólico en la Clínica de Hígado del Hospital General de México, en el que se investiga en forma intencionada en todos los casos la presencia de datos clínicos de daño hepático.

Se evaluó estado nutricional y se interrogará al paciente acerca de su consumo de alcohol y las manifestaciones por infecciones gastrointestinales, pulmonares y cutáneas, así como su duración e intensidad. La evaluación del consumo de alcohol se realizó mediante las pruebas AUDIT (Alcohol Use Disorders Identificación Test) y dependencia a través de DSM IV y el SF-36 para valorar la calidad de vida, además de la Encuesta de Patrón de Consumo de Alcohol GEPR.

De cada participante se realizó somatometría, en donde se tomará en cuenta el peso e índice de masa corporal y porcentaje de grasa determinados por impedancia; lo anterior con la finalidad de evaluar el estado nutricional de cada sujeto. Posteriormente se obtuvo 30 ml de sangre periférica.



Se estratificó la muestra en 3 grupos diferentes con base en el patrón de consumo, así como en el último consumo de alcohol, para poder establecer la estratificación se utilizó una encuesta para valorar el patrón de consumo EPCA (Anexo 2), en dicha encuesta se obtiene información acerca del consumo en su última ocasión, cantidad de consumo y tiempo en el cual se consumió, así como también la frecuencia de consumo durante los últimos tres meses, esta encuesta había sido validado previamente por parte del equipo de investigación (Hernández Ruiz J, et al, 2012), se aplicó la encuesta de valoración AUDIT (Anexo 3), esta encuesta fue diseñada por la OMS para identificar a las personas con un patrón de consumo perjudicial o de riesgo de alcohol (<8 consumo no riesgoso, >8 consumo de riesgo). Los estratos se establecieron de la siguiente manera (Fig. 6):

1. Consumo moderado: Aquellos personas que tuvieran alguno de los siguientes puntos:
  - No tuvieran consumo de alcohol en el último mes.
  - Su patrón de consumo habitual y en su último consumo fuera en mujeres  $\leq 1$  copas por día y en hombres  $\leq 2$  copas por día.
2. Consumo intermedio: aquellas personas que su patrón de consumo habitual y en su último consumo fuera en mujeres de 2-3 copas por día y en hombres de 3-4 copas por día.
3. Consumo BIFIS: aquellas personas que su patrón de consumo habitual y en su último consumo fuera en mujeres  $\geq 4$  copas en dos horas y en hombres de  $\geq 5$  copas en dos horas.

## GRUPO DE CONSUMO DE ACUERDO A NUMERO DE COPAS Y GÉNERO

		MUJERES	HOMBRES		
Moderado	}	0	0	Moderado	}
		1	1		
Intermedio	}	2	2	Intermedio	}
		3	3		
BIFIS	}	4	4	BIFIS	}
		5	5		
		>5	>5		

Figura. 6

### 7.1 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO.

Es un estudio descriptivo, de casos y controles, transversal y prolectivo.

### 7.2 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

55 casos divididos en 3 grupos

Grupo 1 moderado 20 individuos

Grupo 2 Intermedio 18 individuos

Grupo 3 BIFIS 17 individuos

Y todos los grupos sin hepatitis viral.

Para calcular el tamaño de muestra se utilizó un análisis de una vía con factores fijos en el programa “Stat Soft,inc incorporation (2007) versión 8.0”

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para la diferencia de medias con base en el artículo de Naude et al (Alcohol. 201), se obtuvo la varianza y se estableció la diferencia esperada en los grupos, quedando de la siguiente manera:

Fórmula para la diferencia de medias:

$$N = \frac{2 \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot s^2}{d^2}$$

En donde:

- $Z\alpha$ : 1.96
- $Z\beta$ : 0.84
- $s^2$ : 27225
- $d^2$ : 25600

Para tener un poder del 80% se requieren 16 pacientes por grupo

## 7.3 CRITERIOS

### 7.3.1 Criterios de inclusión:

Aceptar participar en el estudio (firma de consentimiento informado).

Entre 18 y 29 años de edad.

No haber consumido alcohol 24 horas previas a la toma de la muestra.

### 7.3.2 Criterios de exclusión:

Para casos y controles:

- a) No poder obtener la muestra de sangre para determinar el perfil linfocitario y todas las pruebas bioquímicas.
- b) Presentar alguna alteración neurológica, psiquiátrica, antecedentes de traumatismos craneoencefálicos con pérdida del estado de alerta.
- c) Enfermedades que pueden alterar el sistema inmune, tales como, desnutrición de cualquier grado, Diabetes Mellitus, VIH-SIDA.
- d) Hepatopatía o nefropatía de cualquier origen.
- g) Enfermedades de tipo autoinmune.
- h) Tuberculosis o antecedente de haberla padecido.
- i) Neoplasias de cualquier origen.
- j) Uso de fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores o esteroides por cualquier causa.
- k) Embarazadas o lactando.

### 7.3.3 Criterios de eliminación.

- I. Inicio de tratamientos inmunomoduladores o hepatotóxicos una vez incluido en el estudio.
- II. Que resulte positivo a algún antígeno viral.
- III. Imposibilidad de realizar las determinaciones en las muestras de sangre periférica.
- IV. Que ya no desee participar en el estudio.

## **8. PROCEDIMIENTO**

De cada participante se realizó somatometría, en donde se tomó en cuenta el peso determinado por impedancia e índice de masa corporal, además de pliegue cutáneo tricipital medido con plicómetro, y la circunferencia braquial; lo anterior con la finalidad de evaluar el estado nutricional de cada sujeto. Se obtuvo 30 ml de sangre periférica para determinar biometría hemática completa (BH), química sanguínea (QS), tiempo de protrombina (TP), pruebas de funcionamiento hepático (PFH) perfil de lípidos y panel viral para hepatitis B y C.

Se analizó el perfil de activación y direccionamiento de las células polimorfonucleares de sangre periférica por citometría de flujo con anticuerpos contra CD69, CXCR4, CCR5, CCR4, así como linfocitos TCD3 con expresión de CCR5.

### **8.1 ANALISIS ESTADISTICO**

Se aplicaron pruebas de homogeneidad de varianza y bondad de ajuste para elegir el modelo estadístico más apropiado para evaluar si existe correlación entre el patrón de consumo y el perfil de activación y direccionamiento de los linfocitos periféricos con expresión de CCR5 (T de student).

### **8.2 ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD.**

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección III, investigación con riesgo mayor al

mínimo, se anexa hoja de consentimiento informado. Se guardará la confidencialidad de los datos utilizando únicamente un código para interrelacionar los datos obtenidos. Las muestras se almacenarán hasta por cinco años para completar los estudios planteados.

## 9. RESULTADOS

Para este estudio se reclutaron en total 55 pacientes, distribuidos en 3 grupos, el de consumo las características demográficas de la población fueron las siguientes 30 mujeres y 25 hombres.

**DISTRIBUCION POR EDAD Y GRUPO**

GRUPO	PROMEDIO EDAD	DESVIACION ESTANDAR
MODERADO	22.00	2.68
INTERMEDIO	24.38	3.09
BIFIS	25.11	3.34

Tabla.1

**DISTRIBUCION POR SEXO Y GRUPO**

GRUPO	FEMENINO	MASCULINO
MODERADO	12	8
INTERMEDIO	9	9
BIFIS	9	12
TOTAL	30	25

Tabla 2.

De este grupo demográfico se seleccionó los BIFIS y los Moderados para realizar el análisis, y se excluyeron los intermedios.

El análisis de expresión de los receptores de quimiocinas se realizó sobre la región seleccionada de polimorfonucleares (PMN) de acuerdo a la apariencia de tamaño y complejidad (FSC vs SSC), y en la gráfica siguiente aparece en color rojo:

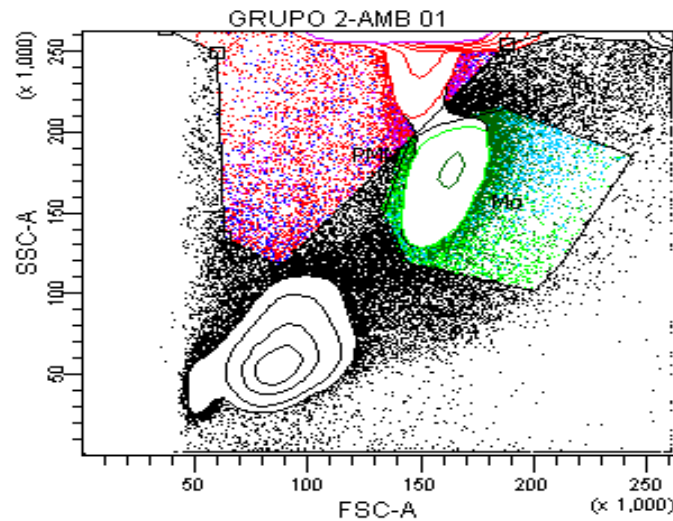
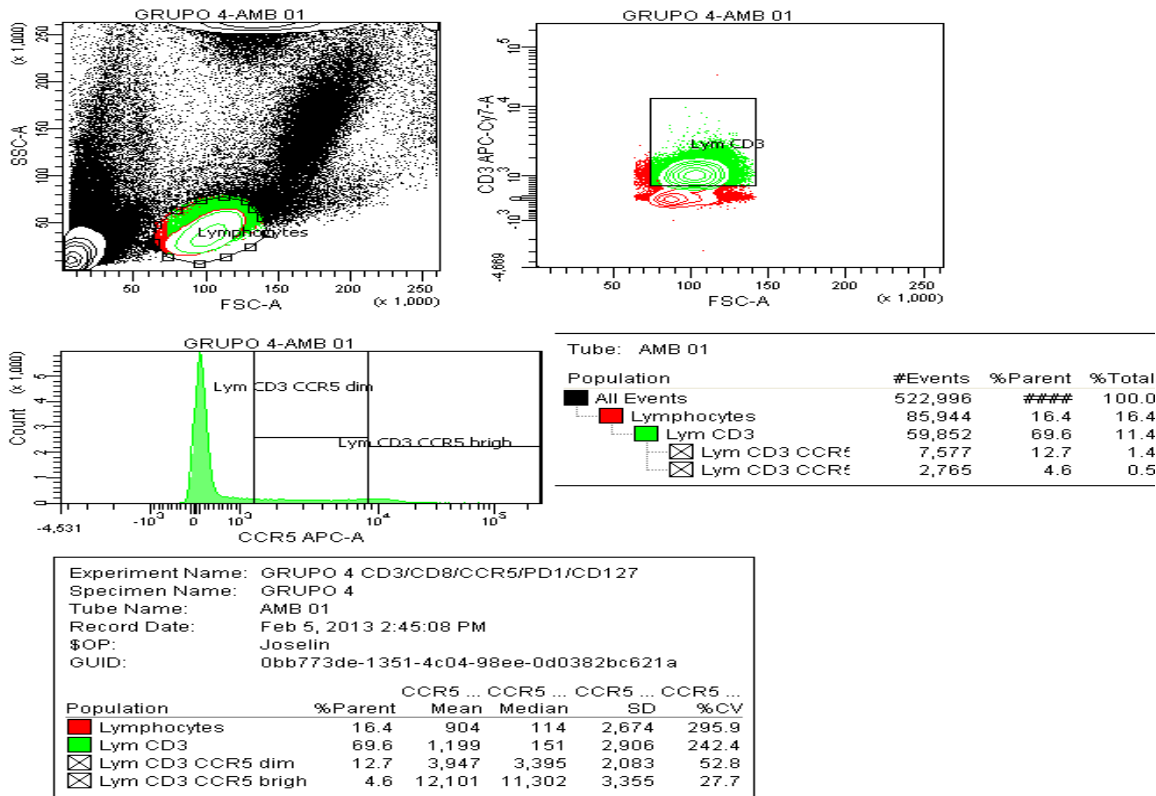


Figura 7. Citometria de flujo PMN

Posteriormente se graficó la expresión de los receptores de quimiocinas y se determinó la intensidad media de fluorescencia y el porcentaje de células positivas para cada receptor, en este ejemplo específicamente la expresión de CCR5 en los linfocitos subgrupo CD3 como sigue a continuación:

Figura 8. Citometria de flujo Linfocitos CD3 y expresión CCR5



Los datos recopilados se adicionaron a la base de datos general y se operaron estadísticamente en conjunto con el programa SPSS.

Las variables que se tomaron en cuenta las cuales fueron estadísticamente significativas fueron:

- 1) Lymphocytes\_CCR5\_APCA\_Median
- 2) Lym\_CD3\_CCR5\_brigh\_CCR5\_APCA\_Median



La media de Lym\_CD3\_CCR5\_brigh\_CCR5\_APCA se eliminó al ser la misma variable.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Lymphocytes_CCR5_APCA_Mean	Se han asumido varianzas iguales	.977	.331	-.234	29	.817	-42.55042	181.94907	-414.67805	329.577 21
	No se han asumido varianzas iguales			-.244	27.343	.809	-42.55042	174.27968	-399.93274	314.831 90
Lymphocytes_CCR5_APCA_Median	Se han asumido varianzas iguales	<b>1.174</b>	<b>.287</b>	<b>2.750</b>	<b>29</b>	<b>.010</b>	<b>190.12185</b>	<b>69.12885</b>	<b>48.73747</b>	<b>331.506 22</b>
	No se han asumido varianzas iguales			<b>2.709</b>	<b>25.866</b>	<b>.012</b>	<b>190.12185</b>	<b>70.17208</b>	<b>45.84458</b>	<b>334.399 12</b>
Lym_CD3_CCR5_dim_CCR5_APCA_Mean	Se han asumido varianzas iguales	.327	.572	-1.109	29	.277	-228.37395	205.93109	-649.55033	192.802 43
	No se han asumido varianzas iguales			-1.145	28.540	.262	-228.37395	199.45591	-636.59270	179.844 80
Lym_CD3_CCR5_brigh_CCR5_APCA_Mean	Se han asumido varianzas iguales	<b>2.055</b>	<b>.163</b>	<b>-2.323</b>	<b>28</b>	<b>.028</b>	<b>1498.00000</b>	<b>644.74747</b>	<b>-2818.70531</b>	<b>177.294 69</b>
	No se han asumido varianzas iguales			<b>-2.379</b>	<b>26.825</b>	<b>.025</b>	<b>1498.00000</b>	<b>629.77583</b>	<b>-2790.58761</b>	<b>205.412 39</b>
Lym_CD3_CCR5_brigh_CCR5_APCA_Median	Se han asumido varianzas iguales	<b>1.523</b>	<b>.227</b>	<b>-2.386</b>	<b>28</b>	<b>.024</b>	<b>1461.58929</b>	<b>612.49450</b>	<b>-2716.22740</b>	<b>206.951 17</b>
	No se han asumido varianzas iguales			<b>-2.435</b>	<b>27.328</b>	<b>.022</b>	<b>1461.58929</b>	<b>600.35280</b>	<b>-2692.72082</b>	<b>230.457 75</b>

Tabla 3. Prueba de muestras independientes T de student.  
Negrita: variables con p significativa <0.05

Se analizaron las estadísticas de grupo como se ve en la siguiente tabla:

	Categoría	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Lymphocytes_CCR5_APCA_Mean	moderados	14	1191.2143	372.24747	99.48732
	bifis	17	1233.7647	589.98862	143.09326
<b>Lymphocytes_CCR5_APCA_Median</b>	<b>moderados</b>	<b>14</b>	<b>476.3571</b>	<b>206.97254</b>	<b>55.31574</b>
	<b>bifis</b>	<b>17</b>	<b>286.2353</b>	<b>178.02511</b>	<b>43.17743</b>
Lym_CD3_CCR5_dim_CCR5_APCA_Mean	moderados	14	3481.2143	463.15892	123.78443
	bifis	17	3709.5882	644.84204	156.39717
Lym_CD3_CCR5_brigh_CCR5_APCA_Mean	moderados	14	12190.0000	1413.67094	377.81945
	bifis	16	13688.0000	2015.42078	503.85520
<b>Lym_CD3_CCR5_brigh_CCR5_APCA_Median</b>	<b>moderados</b>	<b>14</b>	<b>11310.2857</b>	<b>1395.71578</b>	<b>373.02073</b>
	<b>bifis</b>	<b>16</b>	<b>12771.8750</b>	<b>1881.61218</b>	<b>470.40304</b>

Tabla 4. Estadística de grupo.  
**Negrita: variables estadísticamente significativas**

Se encontró que en el grupo de los los BIFIS tienen menos CCR5 en sus linfocitos perifericos (Bifis 286.23 IMF +/- 178.02 vs Moderados 476.3571 IMF +/- 206.97; p=0.01) pero más CCR5 en los linfocitos T que poseen CCR5 en gran cantidad (Brigh) (Bifis 12771.87 IMF +/- 1881.6 vs Moderados 11310.28 IMF +/- 1395.7; p=0.02) como se describe en las tablas 1 y 2 antes mencionadas y en las Figuras 9 y 10:

Figura. 9 Expresión de CCR5 en linfocitos periféricos.

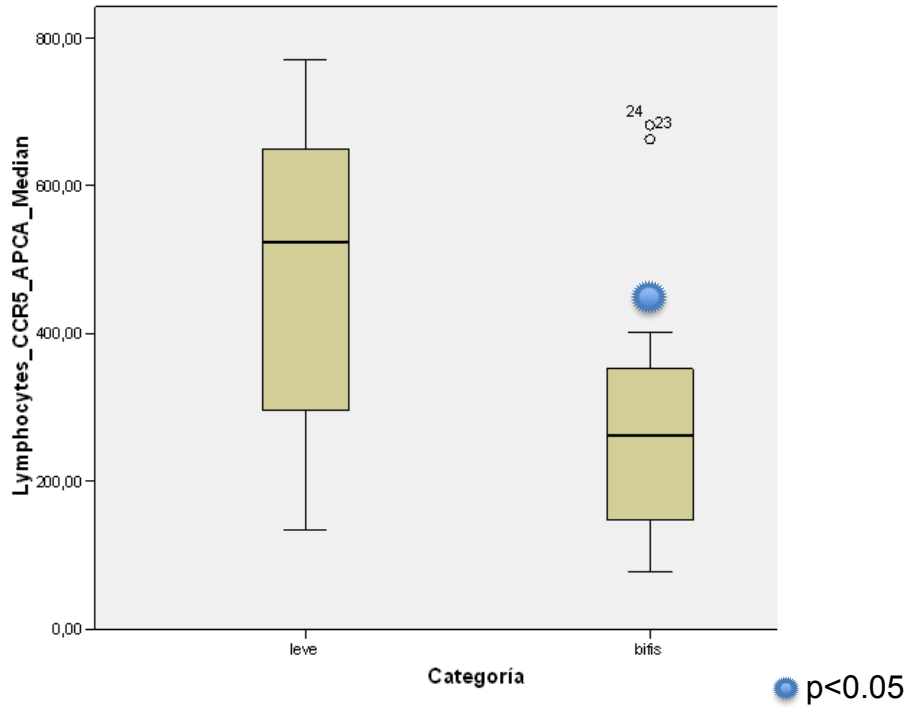
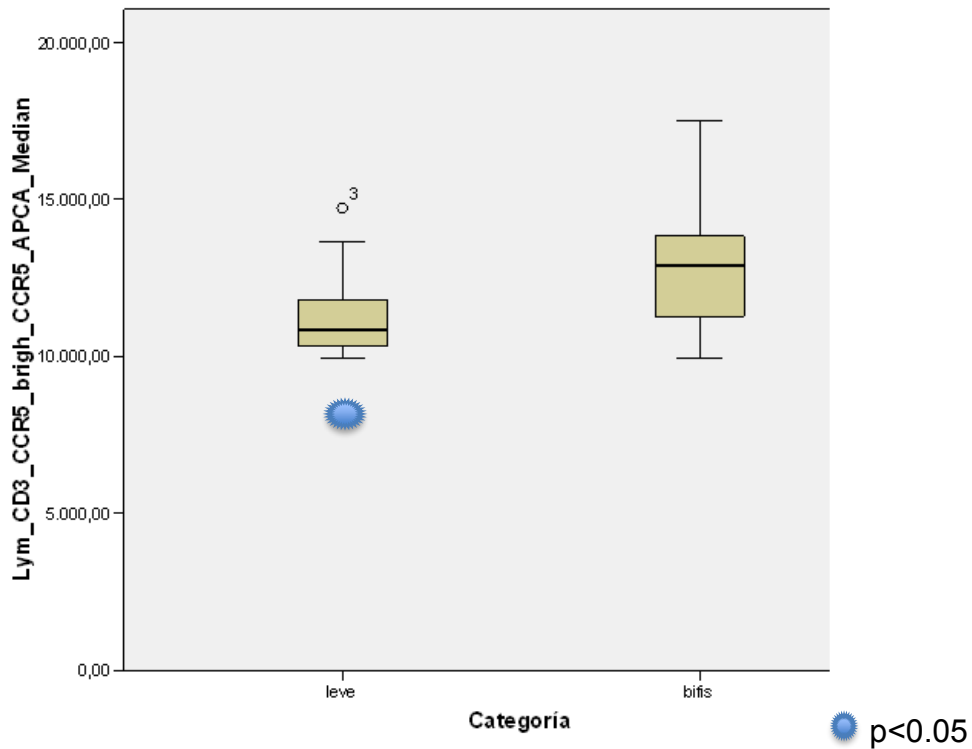


Figura 10. Expresión de CCR5 en los linfocitos T CD3 brigh



## 10. DISCUSION

En los resultados se puede apreciar cómo el consumo de alcohol genera una alteración inmunológica, predominantemente en aquella población de linfocitos que expresan CCR5. Se demuestra que en los BIFIS, la expresión de CCR5 es menor a nivel periférico, tal vez se explique porque se infiltraron al hígado aquellos linfocitos con gran expresión de CCR5 y al parecer también se puede ver afectado el fenotipo inmunológico en la activación, capacidad citotóxica y el perfil de tráfico periférico, así como fue demostrado en el estudio de Saldívar et al, del 2015 en donde los linfocitos CD8 se vieron modificados fenotípicamente en los adultos jóvenes bebedores compulsivos (Binge).

Con base en el estudio *in vitro* de Karim et al, en el cual posterior al estímulo con alcohol, los linfocitos presentan un aumento en el direccionamiento y adhesión en las biopsias hepáticas, podemos sugerir que la disminución en la cantidad de linfocitos periféricos, en sujetos con un patrón de consumo tipo BIFIS, se puede deber a que estos están siendo reclutados al hígado; sin embargo, esto no puede ser confirmado debido a la falta de una biopsia hepática. Estos resultados favorecen en un futuro poder buscar intencionalmente estos marcadores en biopsias hepáticas.

Por otro lado, se encontró que los linfocitos TCD3 con expresión de CCR5 tienen más CCR5 en el grupo de consumo de patrón moderado que en los BIFIS, y retomando estudios como el de Moreno et al en ratones a los cuales se les indujo hepatitis con concavalina A y se demostró que una mayor expresión de CCR5 puede

modular la gravedad de la lesión hepática inmuno mediada, por lo tanto queda puesta la posibilidad que en los adultos jóvenes con patrón de consumo moderado de alcohol se active esta expresión de CCR5 en los linfocitos como factor protector inicial.

## **11. CONCLUSIONES**

Podemos concluir que el alcohol previo a cualquier alteración clínica, tiene una afección directa en el sistema inmune al verse reflejado al presentarse diferencias estadísticamente significativas en el grupo BIFIS en relación con el grupo moderado: los linfocitos periféricos del grupo BIFIS presento menor expresión de CCR5 con una alta posibilidad de que estos se infiltren al hígado generando daño hepático temprano y con linfocitos TCD3 con expresión de CCR5 que se sobreexpresan mas en los adultos jóvenes de consumo moderado como posible factor modulador en el daño hepático, para lo cual se requieren estudios *in vivo*.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Nagata K, Suzuky H, Sakaguchi S. *COMMON PATHOGENIC MECHANISM IN DEVELOPMENT PROGRESSION OF LIVER INJURY CAUSED BY NON- ALCOHOLIC OR ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS*. The Journal of Toxicological Sciencies, Vol. 32, No. 5, 453-468, 2007.
2. Albano E. *ROLE OF ADAPTIVE IMMUNITY IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. International Journal of Hepatology. Vol. 2012, ID. 893026. 1-7
3. Jimenez- Ortega V, Fernández- Mateos M, Cano Barquilla P, et. Al. *CONTINUOS VERSUS DISCONTINUOUS DRINKING OF AN ETHANOL LIQUID DIET IN PERIPUBERTAL RATS: EFFECT ON 24-H VARIATION OF LYMPH NODE AND SPLENIC MITOGENIC RESPONSES AND LYMPHOCYTE SUBSETS POPULATIONS*. Alcohol 45(2011) 183-92
4. Duddempudi A. *IMMUNOLOGY IN ALCOHOL LIVER DISEASE*. Clinical Liver Disease 16(2012) 687-98
5. Petrasek J, Mandekar P, Szabo G. *TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF ALCOHOL LIVER DISEASE*. Gastroenterology Research and Practice, Vol 2010, ID 710381, pag 1-12
6. Bautista A. *NEUTROPHILIC INFILTRATION IN ALCOHOL HEPATITIS*. Alcohol 27(2002) 17-21
7. Dhanda A, Lee R, Collins P, McCune A. *MOLECULAR TARGETS IN THE TREATMENT OF ALCOHOLIC HEPATITIS*. World Journal of Gastroenterology. 2012, October 21; 18(39):5504-13
8. Gao B, et al. *INNATE IMMUNITY IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. American Journal of
9. Li TK. *QUANTIFYING THE RISK FOR ALCOHOL-USE AND ALCOHOL-ATTRIBUTABLE HEALTH DISORDERS: PRESENT FINDINGS AND FUTURE RESEARCH NEEDS*. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Mar;23 Suppl 1:S2-8.

10. World Health Report 2011: Global status report on alcohol and health. World Health Organization, Switzerland 2011.
11. Kim JH, Lee S, Chow J, Lau J, Tsang A, Choi J, et al. *PREVALENCE AND THE FACTORS ASSOCIATED WITH BINGE DRINKING, ALCOHOL ABUSE, AND ALCOHOL DEPENDENCE: A POPULATION-BASED STUDY OF CHINESE ADULTS IN HONG KONG*. Alcohol Alcohol. 2008 May-Jun;43(3):360-70.
12. Lim WY, Fong CW, Chan JM, Heng D, Bhalla V, Chew SK. *TRENDS IN ALCOHOL CONSUMPTION IN SINGAPORE 1992 2004*. Alcohol Alcohol. 2007 Jul-Aug;42(4):354-61.
13. Kuntsche E, Rehm J, Gmel G. *CHARACTERISTICS OF BINGE DRINKERS IN EUROPE*. Soc Sci Med. 2004 Jul;59(1):113-27.
14. Encuesta Nacional de Adicciones 2008, Secretaria de Salud, México 2008.
15. Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Alcohol, Secretaria de Salud, México 2012.
16. Rimsza ME, Moses KS. *SUBSTANCE ABUSE ON THE COLLEGE CAMPUS*. Pediatr Clin North Am. 2005 Feb;52(1):307-19.
17. Brower AM. *ARE COLLEGE STUDENTS ALCOHOLICS?* J Am Coll Health. 2002 Mar;50(5):253-5.
18. NIAAA [National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism]. National Advisory Council on Alcohol Abuse and Alcoholism. Summary of Meeting:4-5 February, 2004.
19. Dawson DA. *DEFINING RISK DRINKING*. Alcohol Res Health. 2011;34(2):144-56.
20. Rehm J, et al. *ALCOHOL, SOCIAL DEVELOPMENT AND INFECTIOUS DISEASE*. Toronto, ON: Centre for Addiction and Mental Health, 2009.
21. Rehm J. *THE RISKS ASSOCIATED WITH ALCOHOL USE AND ALCOHOLISM*. Alcohol Res Health. 2011;34(2):135-43.
22. Nelson S, Kolls JK. *ALCOHOL, HOST DEFENCE AND SOCIETY*. Nat Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):205-9.

23. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V., et al. *CARCINOGENICITY OF ALCOHOLIC BEVERAGES*. *Lancet Oncol*. 2007 Apr;8(4):292-3.
24. Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, et al. *ALCOHOL AS A RISK FACTOR FOR TYPE 2 DIABETES: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*. *Diabetes Care*. 2009 Nov;32(11):2123-32.
25. Kessler RC, Crum RM, Warner LA, et al. *LIFETIME CO-OCCURRENCE OF DSM-III-R ALCOHOL ABUSE AND DEPENDENCE WITH OTHER PSYCHIATRIC DISORDERS IN THE NATIONAL COMORBIDITY SURVEY*. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Apr;54(4):313-21.
26. Rehm J, Rehn N, Room R, Monteiro M, Gmel G, Jernigan D, et al. *THE GLOBAL DISTRIBUTION OF AVERAGE VOLUME OF ALCOHOL CONSUMPTION AND PATTERNS OF DRINKING*. *Eur Addict Res*. 2003 Oct;9(4):147-56.
27. Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. *ALCOHOL DOSING AND TOTAL MORTALITY IN MEN AND WOMEN: AN UPDATED META-ANALYSIS OF 34 PROSPECTIVE STUDIES*. *Arch Intern Med*. 2006 Dec 11-25;166(22):2437-45.
28. Taylor B, Irving HM, Kanteres F, Room R, Borges G, Cherpitel C, et al. *THE MORE YOU DRINK, THE HARDER YOU FALL: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF HOW ACUTE ALCOHOL CONSUMPTION AND INJURY OR COLLISION RISK INCREASE TOGETHER*. *Drug Alcohol Depend*. 2010 Jul 1;110(1-2):108-16.
29. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). *RETHINKING DRINKING: ALCOHOL AND YOUR HEALTH*. Pub. No. 10-3770. Rockville, MD: NIAAA, 2010.
30. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. *MODERATE ALCOHOL INTAKE AND LOWER RISK OF CORONARY HEART DISEASE: META-ANALYSIS OF EFFECTS ON LIPIDS AND HAEMOSTATIC FACTORS*. *BMJ*. 1999;319: 1523-1528.



31. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, et al. *DIFFERENT EFFECTS OF RED WINE AND GIN CONSUMPTION ON INFLAMMATORY BIOMARKERS OF ATHEROSCLEROSIS: A PROSPECTIVE RANDOMIZED CROSSOVER TRIAL: EFFECTS OF WINE ON INFLAMMATORY MARKERS*. *Atherosclerosis*. 2004; 175:117-123.
32. Gao B, Bataller R. *ALCOHOLIC LIVER DISEASE: PATHOGENESIS AND NEW THERAPEUTIC TARGETS*. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1572-85.
33. Ely M, Hardy R, Longford NT, Wadsworth ME. *GENDER DIFFERENCES IN THE RELATIONSHIP BETWEEN ALCOHOL CONSUMPTION AND DRINK PROBLEMS ARE LARGELY ACCOUNTED FOR BY BODY WATER*. *Alcohol Alcohol*. 1999;34:894-902.
34. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. *ACETALDEHYDE ADDUCTS IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3:178–185.
35. Farfan Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Konigsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, et al. *ACETALDEHYDE-INDUCED MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION SENSITIZES HEPATOCYTES TO OXIDATIVE DAMAGE*. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:599–609.
36. Vidali M, Stewart SF, Albano E. *INTERPLAY BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND IMMUNITY IN THE PROGRESSION OF ALCOHOL-MEDIATED LIVER INJURY*. *Trends Mol Med* 14:63–71
37. Szabo G, Mandrekar P. *A RECENT PERSPECTIVE ON ALCOHOL, IMMUNITY, AND HOST DEFENSE*. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Feb;33(2):220-32.
38. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, et al. *ENTERIC DYSBIOSIS ASSOCIATED WITH A MOUSE MODEL OF ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. *Hepatology* 2011;53:96–105.
39. Rao R. *ENDOTOXEMIA AND GUT BARRIER DYSFUNCTION IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. *Hepatology* 2009;50:638–644.
40. Van Pelt FN, Straub P, Manns MP. *MOLECULAR BASIS OF DRUG-*

- INDUCED IMMUNOLOGICAL LIVER INJURY*. Semin Liver Dis. 1995 Aug;15(3):283-300.
41. Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JI, Lin F, Medof ME, *et al*. *DIFFERENTIAL CONTRIBUTIONS OF C3, C5, AND DECAY-ACCELERATING FACTOR TO ETHANOL-INDUCED FATTY LIVER IN MICE*. Gastroenterology 2007;132:1117-1126.
42. Cohen JI, Roychowdhury S, McMullen MR, Stavitsky AB, Nagy LE. *COMPLEMENT AND ALCOHOLIC LIVER DISEASE: ROLE OF C1Q IN THE PATHOGENESIS OF ETHANOL-INDUCED LIVER INJURY IN MICE*. Gastroenterology 2010;139:664–674.
43. Mandal P, Park PH, McMullen MR, Pratt BT, Nagy LE. *THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF ADIPONECTIN ARE MEDIATED VIA A HEME OXYGENASE-1-DEPENDENT PATHWAY IN RAT KUPFFER CELLS*. Hepatology 2010;51:1420–1429.
44. Miller AM, Wang H, Bertola A, Park O, Horiguchi N, Ki SH, *et al*. *INFLAMMATION-ASSOCIATED IL-6/STAT3 ACTIVATION AMELIORATES ALCOHOLIC AND NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASES IN IL-10 DEFICIENT MICE*. Hepatology 2011;54:846–856.
45. Horiguchi N, Wang L, Mukhopadhyay P, Park O, Jeong WI, Lafdil F, *et al*. *CELL TYPE-DEPENDENT PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY ROLE OF SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3 IN ALCOHOLIC LIVER INJURY*. Gastroenterology 2008;134:1148–1158.
46. Shukla SD, Pruetz SB, Szabo G, Arteel GE. *BINGE ETHANOL AND LIVER: NEW MOLECULAR DEVELOPMENTS. ALCOHOL CLIN EXP RES*. 2013 Apr;37(4):550-7.
47. Song K, Coleman RA, Zhu X, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, *et al*. *CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION BY MICE RESULTS IN ACTIVATED SPLENIC T CELLS*. J Leukoc Biol. 2002 Dec;72(6):1109-16.
48. Guo TL, Zhang LX, Chen JP, Nguyen VA, White KL Jr, Gao B. *DIFFERENTIAL STAT5 ACTIVATION AND PHENOTYPIC MARKER*

- EXPRESSION BY IMMUNE CELLS FOLLOWING LOW LEVELS OF ETHANOL CONSUMPTION IN MICE.* Immunopharmacol Immunotoxicol 24:121–138.
49. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. *STAT5 AS A MOLECULAR REGULATOR OF PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND APOPTOSIS IN HEMATOPOIETIC CELLS.* EMBO J. 1999 Sep 1;18(17):4754-65.
50. Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, et al. *IMMUNE STIMULATION OF HEPATIC FIBROGENESIS BY CD8 CELLS AND ATTENUATION BY TRANSGENIC INTERLEUKIN-10 FROM HEPATOCYTES.* Gastroenterology. 2004 Sep;127(3):870-82.
51. Hill DB, Marsano L, Cohen D, Allen J, Shedlofsky S, McClain CJ. *INCREASED PLASMA INTERLEUKIN-6 CONCENTRATIONS IN ALCOHOLIC HEPATITIS.* J Lab Clin Med. 1992 May;119(5):547-52.
52. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. *BIOLOGY OF INTERLEUKIN-22.* SEMIN IMMUNOPATHOL. 2010 Mar;32(1):17-31.
53. Tilg H, Diehl AM. *CYTOKINES IN ALCOHOLIC AND NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.* N Engl J Med. 2000 Nov 16;343(20):1467-76.
54. Dai Q, Pruett SB. *ETHANOL SUPPRESSES LPS-INDUCED TOLL-LIKE RECEPTOR 4 CLUSTERING, REORGANIZATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON, AND ASSOCIATED TNF-ALPHA PRODUCTION.* Alcohol Clin Exp Res. 2006 Aug;30(8):1436-44.
55. Pruett SB, Fan R. *ETHANOL INHIBITS LPS-INDUCED SIGNALING AND MODULATES CYTOKINE PRODUCTION IN PERITONEAL MACROPHAGES IN VIVO IN A MODEL FOR BINGE DRINKING.* BMC Immunol. 2009 Sep 18;10:49.
56. Dai Q, Zhang J, Pruett SB. *ETHANOL ALTERS CELLULAR ACTIVATION AND CD14 PARTITIONING IN LIPID RAFTS.* Biochem Biophys Res Commun 1:37–42.
57. Jaeschke H. *NEUTROPHIL-MEDIATED TISSUE INJURY IN ALCOHOLIC*

- HEPATITIS*. Alcohol 27: 23–27, 2002.
58. Ramaiah SK, Jaeschke H. *HEPATIC NEUTROPHIL INFILTRATION IN THE PATHOGENESIS OF ALCOHOL-INDUCED LIVER INJURY*. Toxicol Mech Methods 2007;17:431–440.
59. Batey RG, Cao Q, Gould B. *LYMPHOCYTE-MEDIATED LIVER INJURY IN ALCOHOL-RELATED HEPATITIS*. Alcohol 27(1):37–41.
60. Haydon G, Lalor PF, Hubscher SG, Adams DH. *LYMPHOCYTE RECRUITMENT TO THE LIVER IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. Alcohol 27(1):29–36.
61. Jerrells TR. *ROLE OF ACTIVATED CD8+ T CELLS IN THE INITIATION AND CONTINUATION OF HEPATIC DAMAGE*. Alcohol 27(1):47–52.
62. Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos MP, Barquilla PC, Cardinali DP, Esquifino AI. *CONTINUOUS VERSUS DISCONTINUOUS DRINKING OF AN ETHANOL LIQUID DIET IN PERIPUBERTAL RATS: EFFECT ON 24-H VARIATION OF LYMPH NODE AND SPLENIC MITOGENIC RESPONSES AND LYMPHOCYTE SUBSET POPULATIONS*. Alcohol. 2011 Mar;45(2):183-92.
63. Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, et al. *INNATE IMMUNITY IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Apr;300(4):G516-25.
64. Albano E, Vidali M. *IMMUNE MECHANISMS IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. Genes Nutr 2010;5:141–147.
65. Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M, et al. *LIPID PEROXIDATION CONTRIBUTES TO IMMUNE REACTIONS ASSOCIATED WITH ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. Free Radic Biol Med 2002;32:38–45.
66. Thiele GM, Duryee MJ, Willis MS, Tuma DJ, Radio SJ, Hunter CD, et al. *AUTOIMMUNE HEPATITIS INDUCED BY SYNGENEIC LIVER CYTOSOLIC PROTEINS BIOTRANSFORMED BY ALCOHOL METABOLITES*. Alcohol Clin Exp Res 2010;34:2126–2136.
67. Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. *IMMUNOLOGIC MECHANISMS OF*

- ALCOHOLIC LIVER INJURY*. Semin Liver Dis 2004;24:273–287.
68. Matos LC, Batista P, Monteiro N, Ribeiro J, Cipriano MA, Henriques P, et al. *LYMPHOCYTE SUBSETS IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. World J Hepatol. 2013 Feb 27;5(2):46-55.
69. Spinozzi F, Rambotti P, Gerli R, Cernetti C, Rondoni F, Frascarelli A, et al. *IMMUNOREGULATORY T CELLS IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE: PHENOTYPICAL DISSECTION OF CIRCULATING LEU3+/T4+ INDUCER T-LYMPHOCYTES*. J Clin Lab Immunol 1987; 23: 161-167.
70. Naude CE, Bouic P, Senekal M, Kidd M, Ferrett HL, Fein G, et al. *LYMPHOCYTE MEASURES IN TREATMENT-NAÏVE 13-15-YEAR OLD ADOLESCENTS WITH ALCOHOL USE DISORDERS*. Alcohol. 2011 Aug;45(5):507-14.
71. Müller C, Wolf H, Göttlicher J, Eibl MM. *HELPER-INDUCER AND SUPPRESSOR-INDUCER LYMPHOCYTE SUBSETS IN ALCOHOLIC CIRRHOSIS*. Scand J Gastroenterol 1991; 26: 295-301
72. Laso FJ, Madruga JI, López A, et al. *DISTRIBUTION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOID SUBSETS IN ALCOHOLIC LIVER CIRRHOSIS: INFLUENCE OF ETHANOL INTAKE*. Alcohol Clin Exp Res 1996
73. Cook RT, Waldschmidt TJ, Cook BL, Labrecque DR, McLatchie K. *LOSS OF THE CD5+ AND CD45RAHI B CELL SUBSETS IN ALCOHOLICS*. Clin Exp Immunol 103:304–310.
74. Cook RT. *ALCOHOL ABUSE, ALCOHOLISM, AND DAMAGE TO THE IMMUNE SYSTEM: A REVIEW*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 22, 1927–1942.
75. Laso FJ, Almeida J, Torres E, Vaquero JM, Marcos M, Orfao A. *CHRONIC ALCOHOL CONSUMPTION IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED CYTOTOXIC PROFILE OF CIRCULATING LYMPHOCYTES THAT MAY BE RELATED WITH THE DEVELOPMENT OF LIVER INJURY*. Alcohol Clin Exp Res. 2010 May;34(5):876-85.
76. McVicker BL, Tuma DJ, Casey CA. *EFFECT OF ETHANOL ON PRO-APOPTOTIC MECHANISMS IN POLARIZED HEPATIC CELLS*. World J

- Gastroenterol 13(37):4960–4966.
77. Karim S, Liaskou E, Hadley S, Youster J, Faint J, Adams DH, et al. *AN IN VITRO MODEL OF HUMAN ACUTE ETHANOL EXPOSURE THAT INCORPORATES CXCR3- AND CXCR4-DEPENDENT RECRUITMENT OF IMMUNE CELLS*. Toxicol Sci. 2013 Mar;132(1):131-41.
78. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6<sup>ta</sup> Edición. Elsevier: España; 2008.
79. Arens R, Schoenberger SP. *PLASTICITY IN PROGRAMMING OF EFFECTOR AND MEMORY CD8 T-CELL FORMATION*. Immunol Rev. 2010 May;235(1):190-205.
80. Zhang N, Bevan MJ. *CD8(+) T CELLS: FOOT SOLDIERS OF THE IMMUNE SYSTEM*. Immunity. 2011 Aug 26;35(2):161-8.
81. Goldsby RA, Kind TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology*, 5<sup>th</sup> Edition New York: W.H. Freeman; 2002.
82. Rot A, Andrian von UH. *CHEMOKINES IN INNATE AND ADAPTIVE HOST DEFENSE: BASIC CHEMOKINESE GRAMMAR FOR IMMUNE CELLS*. Annual Review of Immunology. 2004; 22:891–928.
83. Rossi D, Zlotnik A. *THE BIOLOGY OF CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS*. Annu Rev Immunol. 2000;18:217-42.
84. Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. *RECRUITMENT OF LYMPHOCYTES TO THE HUMAN LIVER*. Immunol Cell Biol. 2002 Feb;80(1):52-64.
85. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. *CHEMOKINE AND CHEMOKINE RECEPTOR INTERACTIONS PROVIDE A MECHANISM FOR SELECTIVE T CELL RECRUITMENT TO SPECIFIC LIVER COMPARTMENTS WITHIN HEPATITIS C-INFECTED LIVER*. J. Immunol. 1999; 163: 6236–43.
86. Ferguson AR, Engelhard VH. CD8 T cells activated in distinct lymphoid organs differentially express adhesion proteins and coexpress multiple chemokine receptors. J Immunol. 2010 Apr 15;184(8):4079-86.



87. Kobayashi N, Takata H, Yokota S, Takiguchi M. Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8+ T cells during peripheral differentiation. *Eur J Immunol.* 2004 Dec;34(12):3370-8.
88. Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, et al. *DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CHEMOKINES AND CHEMOKINE RECEPTORS IN REJECTING HUMAN LIVER TRANSPLANTS.* *Transplantation.* 2001 Dec 27;72(12):1957-67.
89. Okutsu M, Ishii K, Niu KJ, Nagatomi R. *CORTISOL-INDUCED CXCR4 AUGMENTATION MOBILIZES T LYMPHOCYTES AFTER ACUTE PHYSICAL STRESS.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Mar;288(3):R591-9.
90. Egan CE, Daugherty EK, Rogers AB, Abi Abdallah DS, Denkers EY, Maurer KJ. *CCR2 AND CD44 PROMOTE INFLAMMATORY CELL RECRUITMENT DURING FATTY LIVER FORMATION IN A LITHOGENIC DIET FED MOUSE MODEL.* *PLoS One.* 2013 Jun 7;8(6):e65247.
91. Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D. *AN ESSENTIAL ROLE FOR MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 IN ALCOHOLIC LIVER INJURY: REGULATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND HEPATIC STEATOSIS IN MICE.* *Hepatology.* 2011 Dec;54(6):2185-97.
92. Josep María Argimón Pallás, Josep Jiménez Villa. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica.* 3<sup>era</sup> Edición. Elsevier: España; 2004.
93. Macey Marion G. *FLOW CYTOMETRY, PRINCIPLES AND APPLICATIONS.* Human Press, 2007 New Jersey.
94. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. *A ROLE OF CXC CHEMOKINE LIGAND 12/STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1/PRE-B CELL GROWTH STIMULATING FACTOR AND ITS RECEPTOR CXCR4 IN FETAL AND ADULT T CELL DEVELOPMENT IN VIVO.* *J Immunol.* 2003 May 1;170(9):4649-55.
95. Heydtmann M, Hardie D, Shields PL, Faint J, Buckley CD, Campbell JJ, et al.

- DETAILED ANALYSIS OF INTRAHEPATIC CD8 T CELLS IN THE NORMAL AND HEPATITIS C-INFECTED LIVER REVEALS DIFFERENCES IN SPECIFIC POPULATIONS OF MEMORY CELLS WITH DISTINCT HOMING PHENOTYPES.* J Immunol. 2006 Jul 1;177(1):729-38.
96. Zhang H, Meadows GG. *CHRONIC ALCOHOL CONSUMPTION IN MICE INCREASES THE PROPORTION OF PERIPHERAL MEMORY T CELLS BY HOMEOSTATIC PROLIFERATION.* J Leukoc Biol. 2005 Nov;78(5):1070-80.
97. Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D. *AN ESSENTIAL ROLE FOR MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 IN ALCOHOLIC LIVER INJURY: REGULATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND HEPATIC STEATOSIS IN MICE.* Hepatology. 2011 Dec;54(6):2185-97. doi: 10.1002/hep.24599
98. Moreno C, Gustot T, Nicaise C, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, et al. *CCR5 DEFICIENCY EXACERBATES T-CELL-MEDIATED HEPATITIS IN MICE.* Hepatology. 2005; 42(4):854-62.
99. Sacanella E, Estruch R, Gayà A, Fernandez-Sola J, Antunez E, Urbano-Marquez A. *ACTIVATED LYMPHOCYTES (CD25+ CD69+ CELLS) AND DECREASED CD19+ CELL IN WELL-NOURISHED CHRONIC ALCOHOLICS WITHOUT ETANOL RELATED DISEASES.* Alcoholism: clinical and experimental Research. 1998; 22(4):897-901
100. Zaldivar Fujigaki JL, Arroyo Valerio AG, Lopez Alvarenga JC, Gutierrez Reyes EG, Kershenobich D, Hernandez Ruiz J (2015) *ALTERATIONS IN ACTIVATION CYTOTOXIC CAPACITY AND TRAFFICKING PROFILE OF PERIPHEAL CD8T CELLS IN YOUNG ADULT BINGE DRINKERS.* PLoS ONE 10(7): e0132521. doi:10.1371/journal.pone.0132521.



101. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, *et al.* FERMENTED BEVERAGES OF PRE- AND PROTO-HISTORIC China. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17593-8.
102. Borges G, Loera CR. ALCOHOL AND DRUG USE IN SUICIDAL BEHAVIOUR. Curr Opin Psychiatry. 2010 May;23(3):195-204.
103. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. MODERATE ALCOHOL INTAKE AND LOWER RISK OF CORONARY HEART DISEASE: META-ANALYSIS OF EFFECTS ON LIPIDS AND HAEMOSTATIC FACTORS. BMJ. 1999;319: 1523-1528.

# ANEXOS

### 13.1 ANEXO 1.



HOSPITAL  
GENERAL  
de MÉXICO



D1/03/012/045

México, D. F., a 14 de febrero de 2012

**DR. JOSELIN HERNANDEZ RUIZ**  
Unidad de Medicina Experimental  
Presente.

Por este conducto hago de su conocimiento que la última versión del protocolo titulado "INTERRELACION ENTRE EL PATRON DE CONSUMO DE ALCOHOL, LA RESPUESTA INMUNE, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL DAÑO HEPATICO EN JOVENES", con clave de registro D1/12/UME/04/007, así como el consentimiento informado, fueron presentados a las Comisiones de Ética e Investigación quienes dictaminaron su **A P R O B A C I O N**. Le informo que el apoyo de los recursos para su proyecto, dependerán de la disponibilidad del presupuesto asignado a la Dirección de Investigación.

Atentamente  
Director de Investigación



DR. JUAN CARLOS LOPEZ ALVARENGA

Nota: Este proyecto será apoyado con presupuesto federal.

c.c.p.- Lic. Félix M. Morales Sánchez

JCLA/YRT/cvc\*

**DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN**  
[www.hgm.salud.gob.mx](http://www.hgm.salud.gob.mx)

Dr. Balmis 148  
Colonia Doctores  
Delegación Cuauhtémoc  
México, DF 06726

**T** +52 (55) 5004 3842  
**Con** +52 (55) 2789 2000  
**Ext** 1164

Imagen carta aceptación protocolo registro D1/03/12/045

### 13.2 ANEXO 2

Folio: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_  
 Fecha de elaboración: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_  
 Edad: \_\_\_\_\_ Cintura: \_\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_  
 Dónde nacieron tu(s):  
 Papá: \_\_\_\_\_ Abuelos paternos  
 \_\_\_\_\_  
 Mamá: \_\_\_\_\_ Abuelos maternos  
 \_\_\_\_\_

**A continuación hay una serie de preguntas que nos permitirán conocer tu patrón de consumo de alcohol. Esto nos ayudará en un futuro a entender este fenómeno y su relación con la salud del hígado. Agradecemos tu sinceridad y disposición para contestarla.**

1. ¿Cuándo fue la última vez que tomaste una bebida alcohólica?

Opciones	Marque X
Ayer	
Hace 2-6 días	
Hace 1-3 semanas	
Hace 1-6 meses	
Hace más de 6 meses	
Nunca ha tomado alcohol	

2. ¿Qué tipo o tipos de bebida tomaste en la última ocasión

3.- ¿Cuántas copas o botellas te tomaste?

Tipo de bebida	# bebidas por ocasión
Tequila, vodka, ron, brandy, whisky, mezcal etc	
Cerveza	
Cocteles, aguas locas	
Vino	
Baileys, rompope	
Pulque	
Alcohol del 96	

4.- ¿En cuánto tiempo te las tomaste?

HORAS

5. ¿Siempre tomas de esta manera?

Si	
No	

6. ¿En los últimos tres meses, con qué frecuencia has tomado?

	Marque X
Todos los días	
Entre 5 o 6 veces a la	
Entre 3 o 4 veces a la	
1 o 2 veces a la semana	
Esporádicamente	
No he tomado nada	

7. ¿Cuántos años tenías la primera vez que tomaste una bebida alcohólica?

Años	
------	--

8. ¿A qué edad fue tu primera borrachera?

Años	
------	--

9. Dime: ¿Que tomaste en tu primera borrachera?

10.- ¿Cuántas copas o botellas te tomaste?

Tipo de bebida	# bebidas por
Tequila, vodka, ron, brandy, whisky,	
Cerveza	
Cocteles, aguas locas	
Vino	
Baileys, rompopo	
Pulque	
Alcohol del 96	

11. ¿En cuánto tiempo te las tomaste?

HORAS

12. ¿Seguiste tomando así? No\_\_ (pasar a la pregunta 14) Si\_\_ 13. ¿Por cuánto tiempo seguiste tomando así? \_\_\_\_\_

En el momento de tu vida en el que has tomado más alcohol

14. ¿Qué tomaste?

15. ¿Cuántas copas o botellas te tomaste?

Tipo de bebida	# bebidas por
Tequila, vodka, ron, brandy, whisky,	
Cerveza	
Cocteles, aguas locas	
Vino	
Baileys, rompope	
Pulque	
Alcohol del 96	

HORAS

16. ¿En cuánto tiempo te las tomaste?

17. ¿Qué tan frecuentemente lo hacías?

	Marque X
Todos los días	
Entre 5 o 6 días a la semana	
Entre 3 o 4 veces a la semana	
1 o 2 veces a la semana	
Esporádicamente	
Nunca volví a tomar así	

18. ¿Cuánto tiempo duró esta forma de tomar? \_\_\_\_\_

19. ¿Cuántos años tenías en esa época? \_\_\_\_\_

20. ¿A qué edad dejaste de tomar de esta forma? \_\_\_\_\_

21. ¿Tomas algún medicamento? Si\_ No\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

22. ¿Estás enfermo de algo? Si\_ No\_ ¿De qué? \_\_\_\_\_

23. ¿En la última semana te has enfermado de algo? Si\_ No\_

### 13.3 ANEXO 3

#### Test de Identificación de Trastornos por consumo de alcohol: versión de entrevista.

Lea las preguntas tal como están escritas. Registre las respuestas cuidadosamente. Empezar el Avoir diciendo «Ahora voy a hacerle algunas preguntas sobre su consumo de bebidas alcohólicas durante el último año». Explique qué entiende por «bebidas alcohólicas» utilizando ejemplos típicos como cerveza, vino, vodka, etc. Codifique las respuestas en términos de consumiciones («bebidas estándar»). Marque la cifra de la respuesta adecuada en el recuadro de la derecha.

<p>1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica? (0) Nunca (Pase a las preguntas 9-10) (1) Una o menos veces al mes (2) De 2 a 4 veces al mes (3) De 2 a 3 veces a la semana (4) 4 o más veces a la semana</p>	<p>6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p>
<p>2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal? (0) 1 o 2 (1) 3 o 4 (2) 5 o 6 (3) 7, 8, o 9 (3) 10 o más</p>	<p>7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p>
<p>3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario Pase a las preguntas 9 y 10 si la suma total de las preguntas 2 y 3 = 0</p>	<p>8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p>
<p>4. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p>	<p>9. ¿Usted o alguna otra persona ha resultado herido porque usted había bebido? (0) No (2) Sí, pero no en el curso del último año (4) Sí, el último año</p>
<p>5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido? (0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p>	<p>10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario ha mostrado preocupación por su consumo de bebidas alcohólicas o le han sugerido que deje de beber? (0) No (2) Sí, pero no en el curso del último año (4) Sí, el último año.</p>
<p>Registre la puntuación total aquí</p>	

### ANEXO 3



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA.

Título del protocolo: “**INTERRELACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE CONSUMO DEL ALCOHOL, EL PERFIL LINFOCITARIO, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL DAÑO HEPÁTICO EN JOVENES**”.

Investigador principal: Dr. Joséln Hernández Ruiz.

Sede donde se realizará el estudio: HIPAM, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Se realiza a usted una atenta invitación a participar en este estudio de investigación; si desea participar, deberá conocer y entender los siguientes puntos:

#### **JUSTIFICACIÓN**

El consumo excesivo es perjudicial para la salud, el alcohol se debe tomar con moderación, sin embargo no es clara la diferencia entre consumo moderado y excesivo, más para la población joven. La mayoría de estudios en humanos se han realizado en personas con consumo crónico que tienen entre 30 y 60 años de edad y en modelos de laboratorio, por lo que es necesario hacer un estudio en jóvenes.

#### **OBJETIVO**

Estoy enterado de que este proyecto pretende estudiar cómo el consumo de bebidas alcohólicas modifica los diferentes tipos de células inmunológicas y alteraciones del hígado.

#### **BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio va a ser útil para determinar diferencias en el consumo de alcohol, y cómo se producen alteraciones en las células inmunológicas. Usted recibirá de forma gratuita los resultados de las **pruebas de daño hepático, el perfil de hepatitis B, C y VIH**, para la obtención de los resultados se le solicita comunicarse a los teléfonos referidos en la parte inferior.

#### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

1. Me realizarán **tres encuestas** acerca de mi estado de salud, mis antecedentes y hábitos de consumo de alcohol.
2. Me extraerán 30 ml de sangre (**aproximadamente tres cucharadas soperas**) en una **sola ocasión**, lo cual no tiene efectos negativos sobre mi estado de salud, sin embargo, existe la pequeña posibilidad de formarse un moretón sin consecuencias graves, que desaparecerá en un par de días del sitio de la punción (vena del antebrazo).
3. Me realizarán algunas mediciones corporales como talla y peso con la finalidad de evaluar el índice de masa corporal, **así como de la cintura**.



## ACEPTACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO

El proyecto de investigación corresponde a una investigación sin riesgo.

Mi decisión de participar en el estudio es estrictamente voluntaria, sé que el proceso es estrictamente confidencial, mi nombre no será utilizado en ningún informe cuando los resultados de la investigación sean publicados

Sé también que podré retirarme de la investigación en cualquier momento y no abra ningún tipo de sanción o represalia en contra mía **o de mi familiar**.

Al participar en este proyecto de investigación no recibiré ningún beneficio adicional a obtener los resultados clínicos del estudio, lo cual me ayudará a conocer mi estado de salud, y no se me dará compensación económica ya que este proyecto no tiene ánimo de lucro. En caso de desarrollar algún efecto adverso secundario no previsto como consecuencia de la toma de sangre tengo derecho a una indemnización.

Puedo comunicarme con el Dr. Joselín Hernández Ruíz a los teléfonos 56-23-26-84 y 56-23-36-73 del laboratorio HIPAM Dpto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM y con la Dra. Estela García Elvira, Presidente de la Comisión de Ética, al teléfono 50043866 y al 27892000 ext.1330 si tuviese alguna duda o pregunta relacionado con los derechos de los sujetos de investigación.

Mi firma abajo indica que he leído y entendido el consentimiento informado y que he tenido la oportunidad de hacer preguntas, que me han la dado información más precisa que ha sido posible, y que estoy de acuerdo en mi participación en el estudio

Nombre y Firma del Participante

---

Nombre y Firma del Médico que Ingresa al Paciente

---

Nombre y Firma, Dirección y Teléfono del Testigo

---

Nombre y Firma, Dirección y Teléfono del Testigo

---

Fecha \_\_\_\_\_