



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**“EVALUACIÓN DE CÉLULAS T-CD4, T-CD8 Y NK EN PACIENTES CON ALCOHOLISMO Y
CIRROSIS HEPÁTICA POR ALCOHOL”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

KARLA ZAIRA MEDINA AVILA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. AURORA ELIZABETH SERRALDE ZUÑIGA
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Programa de
**MAESTRÍA Y
DOCTORADO**^{en}
Ciencias Médicas
Odontológicas
y de la Salud

OFICIO: FQUIM / JDCE / 30 / 2017

ASUNTO: JURADO DE EXAMEN,
(Ciudad Universitaria)

Coordinación

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

At'n: **C.P. AGUSTÍN MERCADO**
Director de Certificación y Control Documental

Por medio de la presente, le informo a usted que el H. Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud, Maestría en Investigación Clínica Experimental en Salud –Bioquímica Clínica, en su sesión del 18 de octubre del 2017, acordó poner a su consideración el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias, de la alumna **MEDINA AVILA KARLA ZAIRA** con número de cuenta **304108736**, en la modalidad de "Tesis" que lleva por título "Evaluación de células T, CD4, CD8 y NK en pacientes con alcoholismo y cirrosis hepática por alcohol.", bajo la dirección del **Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes**.

Presidente: **Dr. Luis Felipe Montaña Estrada– Facultad de Medicina, UNAM**

Vocal: **Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes – Hospital General de México, "Eduardo Liceaga"**

Vocal: **Dra. Aurora Elizabeth Serralde Zúñiga– Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "SZ".**

Vocal: **Dr. Jaime Arellanes Robledo– Instituto Nacional de Medicina Genómica.**

Secretario: **Dr. Julio Granados Arriola– Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "SZ".**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de noviembre de 2018

EL COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Ciudad Universitaria, 04510
tels. 5622-3778 y 68

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

Vocal: Dra. Esperanza Gabriela Gutierrez Reyes

Vocal: Dra. Aurora Elizabeth Serralde Zuñiga

Vocal: Dr. Jaime Arellanes Robledo

Secretario: Dr. Julio Granados Arriola

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, en colaboración con la Clínica de Hígado del Departamento de Gastroenterología y el Banco de Sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, bajo la dirección y asesoría de la Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes.

Agradezco a los miembros del Comité Tutor y Jurado Asignado, por su apoyo, críticas y aportaciones al proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo de agosto del 2014 a agosto de 2016, con número de becario: 582002.

Este trabajo recibió apoyo parcial del proyecto CONACYT Salud 2016-1-272579.

Valar Morghulis

Valar Dohaeris

George R. R. Martin

“Nada en la vida debe temerse, sólo debe comprenderse.
Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Esperanza Gabriela Gutierrez Reyes por su súper híper mega paciencia, confianza, empeño en mi formación académica y profesional a lo largo de todo este tiempo, educarme en la investigación básica y clínica, dejarme aprender de mis errores y aciertos, alimentar mi fuerza mental, por subirse conmigo a un barco a explorar tierra nueva y que, aunque el trayecto ha sido difícil, seguimos en el camino.

Al personal de HIPAM, Leticia Sánchez, Ángel García, Carlos Martínez y Nicanor Maya por el apoyo y trabajo realizado durante todo este tiempo en el laboratorio.

Les agradezco a todas las personas que estuvieron involucrados durante las estandarizaciones de las pruebas, las determinaciones de las muestras, la inclusión de pacientes etc.

A mis queridos amigos y compañeros de HIPAM: Dra. Marina, Dra. Lidia, Thalía, Dorothy, Miriam, Ivonne, Bari, Jessy, Abby, Adri, Alfred, Luis, Erick, Benjamín, Dr. Moisés y Christian, gracias por los momentos en el laboratorio y fuera de, por las risas y bromas, por permitirme conocerlos, trabajar y crecer con ustedes.

A los amigos que encontré en el posgrado Narda y Francisco, aprendí muchas cosas de ustedes ojalá podamos trabajar juntos en el futuro.

A mi familia por ser mi pilar, por todo su amor, confianza y apoyo en todo momento, gracias por alentarme a ser mejor cada día y por ayudarme a cumplir mis objetivos.

A Jorge por su amor, ayuda y comprensión durante todos estos años juntos y los que nos faltan.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, nuestra máxima casa de estudios por darme la oportunidad de continuar creciendo en sus aulas.

ÍNDICE

Contenido

1. RESUMEN	1
2. ABREVIATURAS	2
3. ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS.....	4
3.1 FIGURAS.....	4
3.2 TABLAS DE RESULTADOS	7
4. INTRODUCCIÓN	8
4.1 Consumo de alcohol en el mundo.....	8
4.2 Bebida estándar	9
4.3 Patrones de consumo de alcohol	10
4.4 Consumo de alcohol en México	11
4.5 Enfermedad Hepática Alcohólica	13
4.5.1 Esteatosis hepática.....	13
4.5.2 Esteatohepatitis.....	14
4.5.3 Fibrosis/Cirrosis	16
4.6 Factores asociados a la Enfermedad Hepática Alcohólica	17
4.6.1 Edad.....	17
4.6.2 Género.....	17
4.7 Diagnóstico.....	17
4.8 Tratamiento.....	19
4.9 Sistema inmune y consumo de alcohol.....	19
4.9.1 Inmunidad Innata	20
4.9.2 Inmunidad Adaptativa mediada por células T.....	22
4.9.3 Muerte celular	23
4.9.4 Activación celular	31
4.9.5 Actividad efectora	33
4.9.6 Receptores y ligandos de quimiocinas	34
4.9.7 Citocinas	34
5. JUSTIFICACIÓN	35
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	35

7. HIPÓTESIS	35
8. OBJETIVOS.....	36
8.1 Objetivo general.....	36
8.2 Objetivos específicos.....	36
9. MATERIAL Y MÉTODOS	36
9.1 Diseño del estudio.....	36
9.2 Población de estudio.....	36
9.3 Criterios de selección de la muestra	37
9.3.1 Criterios de inclusión.....	37
9.3.2 Criterios de exclusión	37
9.3.3 Criterios de Eliminación.....	38
9.4 Cálculo del tamaño de la muestra.....	39
9.5 Diagrama de flujo	40
9.6 Obtención de muestras	41
9.7 Separación de Células Mononucleares (CMN).....	41
9.8 Marcadores inmunológicos.....	41
9.8.1 Inmunofenotipo	41
9.8.2 Análisis por citometría de flujo	42
9.8.3 Determinación de citocinas.....	42
9.9 Análisis estadístico	43
10. RESULTADOS	44
10.1 Parámetros demográficos y de consumo de alcohol	44
10.2 Parámetros bioquímicos	44
10.3 Parámetros Inmunológicos	46
10.3.1 Determinación de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+)	46
10.3.2 Determinación de linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+)	49
10.3.3 Determinación de linfocitos NK (CD3-CD56+).....	54
10.3.4 Determinación de citocinas en suero.....	58
10.3.5 Asociaciones	59
11. DISCUSIÓN	60
12. CONCLUSIONES	73
13. PERSPECTIVAS	73

14. REFERENCIAS	74
15. ANEXOS	81
15.1 Anexo 1. Consentimiento informado.....	81
15.2 Anexo 2. Cuestionario AUDIT	84
15.3 Anexo 3. Encuesta personalizada a cerca del consumo de alcohol.	85
15.4 Anexo 4. Carta de aprobación del proyecto en el la Facultad de Medicina, UNAM y del Hospital General de México.	87
15.5 Anexo 5. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4ª Edición (DSM-IV).	

1. RESUMEN

Introducción: En México, la cirrosis hepática ocupa el 4º lugar de mortalidad, la Enfermedad Hepática Alcohólica (EHA) es una de las principales causas, desafortunadamente no se tiene un tratamiento que permita reducir los efectos negativos al sistema inmunológico. Los mecanismos celulares que participan en los procesos inflamatorios son poco conocidos, lo que se conoce es la desregulación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias de acuerdo al consumo de alcohol tanto en modelos animales y estudios *in vitro*; sin embargo, los estudios realizados en humanos son controversiales. Por lo que, es necesario caracterizar y conocer las alteraciones presentes en los linfocitos en humanos con alcoholismo y cirrosis hepática. **Objetivo:** Se caracterizó la activación celular, la capacidad efectora, muerte y tráfico de los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK, así como las concentraciones de citocinas en sangre periférica en 3 grupos de sujetos: con alcoholismo, cirrosis hepática por alcohol y sujetos control. **Material y Métodos:** Estudio transversal que incluyó; 1: sujetos control (CT) que consumieron <10 g/día de alcohol; 2: sujetos con alcoholismo (A) (de acuerdo a criterios de la OMS); 3: pacientes con cirrosis hepática por alcohol (CH) (por criterios clínicos y estudios de gabinete). Se realizó la determinación de las células T-CD4, T-CD8 y NK en la fracción mononuclear periférica, la expresión de moléculas relacionadas con activación, actividad efectora, muerte y tráfico linfocitario, así como citocinas pro y anti-inflamatorias en los diferentes grupos. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA, análisis ortogonales y U-Mann Whitney, considerando significativa $p < 0.05$. **Resultados:** Se incluyeron 55 sujetos; 15 con A, 15 con CH y 25 CT donde el consumo de alcohol por día fue mayor en el grupo de CH; en los parámetros celulares, no hubo diferencias en el número de leucocitos circulantes; no obstante, se observó un aumento en los neutrófilos y monocitos del grupo con CH, así como una disminución en el número y porcentaje de los linfocitos totales. Durante el consumo crónico de alcohol se observaron cambios en la activación de las T-CD4, en T-CD8 se modificó la activación, capacidad efectora y muerte celular. En las células NK, se observaron cambios en activación y muerte. En CH, disminuyó el número de linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK, el porcentaje de células T-CD8 y la viabilidad de las células T, así como la activación, capacidad efectora de las células T-CD8 y NK, muerte y tráfico linfocitario de las tres subpoblaciones. **Conclusiones:** Durante el alcoholismo las características que se modifican son: la activación, capacidad efectora y muerte celular, es decir se afectan algunas funciones de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. En cuanto a las citocinas el ambiente pro-inflamatorio participa de forma activa a pesar de no presentarse modificaciones en las pruebas de función hepática. Sin embargo, las alteraciones se manifiestan en mayor número en pacientes con cirrosis hepática afectando las funciones de las tres poblaciones de linfocitos, principalmente en células citotóxicas como: T-CD8 y NK, así como los mediadores celulares pro y anti-inflamatorios.

2. ABREVIATURAS

A: Alcoholismo.

ALT: Alaninoaminotransferasa.

AST: Aspartatoaminotransferasa.

AUDIT: Prueba de Identificación de Trastornos por el Uso del Alcohol.

BHC: Biometría hemática.

CD: Células Dendríticas.

CH: Cirrosis Hepática.

CHC: Carcinoma hepatocelular.

CK: Células de Kupffer.

CMN: Células mononucleares.

CT: Controles.

CYP2E1: Citocromo P450 2E1.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DSM-IV: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 4ª Edición.

EHA: Enfermedad Hepática por Alcohol.

ENA: Encuesta Nacional de Adicciones.

ENCODAT: Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

FasL: Ligando de Fas.

FITC: Isocianato de Fluoresceína.

FSC: Forward Scatter, determina la dispersión frontal de luz.

GGT: γ - Glutamyltransferasa.

GISAH: Global Information System on Alcohol and Health.

GM-CSF: Factor Estimulante de la Colonia de Granulocitos-Macrófagos.

GSH: Glutatión.

HA: Hepatitis Alcohólica.

HAI: Hepatitis Autoinmune.

Hb: Hemoglobina.

HSC: Células Estelares Hepáticas.

Hto: Hematocrito.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL: Interleucina.

IMC: Índice de masa corporal.

IRM: Imagen por Resonancia Magnética.

LPS: Lipopolisacárido.

MAST: Prueba de Detección de Alcoholismo de Michigan.

Máx: Máximo.

MEC: Matriz Extracelular.

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Min: Mínimo.

NAD⁺: Nicotina Adenina Dinucleótido.

NADPH: Nicotina Adenina Dinucleótido Fosfato.

NIAAA: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.

NK: Células asesinas naturales.

NKG2D: Receptor activador de células NK grupo 2, miembro D.

O₂-: Anión superóxido.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos.

PE: Ficoeritrina.

PE-Cy5: Ficoeritrina-Cianina 5.

PerCP: Proteína Clorofila Peridinina.

PFH: Pruebas de funcionamiento hepático.

PPAR: Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas.

Px: Pacientes.

QS: Química sanguínea.

RRP: Receptores de Reconocimiento de Patrones.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SREBP-1c: Proteína 1c de Unión a los Elementos Reguladores del Esterol.

SSC: Side Scatter, determina la dispersión lateral.

TC: Tomografía Computarizada.

TLR-4: Receptor tipo Toll 4.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

TRAIL: Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF.

VCM: Volumen Corpuscular Medio.

VHC: Virus Hepatitis C.

3. ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

3.1 FIGURAS

Figura 1. Consumo de alcohol *per cápita* por adulto en litros de alcohol puro (L/adulto)

Figura 2. Equivalentes de una bebida estándar según el NIAAA.

Figura 3. Historia Natural de la Enfermedad Hepática Alcohólica.

Figura 4. Complejo formado para la detección de los diferentes analitos en suero.

Figura 5. Linfocitos T-cooperadores, número (a) y frecuencia (b) en las poblaciones de estudio.

Figura 6. Frecuencia de linfocitos T cooperadores viables en los diferentes grupos obtenido por Anexina V y 7AAD

Figura 7. Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos T cooperadores.

- a) Frecuencia de linfocitos T cooperadores que expresan CD25+/IL-2Ra.
- b) Frecuencia de linfocitos T cooperadores que expresan CD69/AIM.

Figura 8. Expresión del receptor y ligando de FAS (CD95+ y CD178+) así como caspasa 3 activa en linfocitos T cooperadores.

- a) Frecuencia de expresión del receptor de Fas/CD95+
- b) Expresión del ligando de Fas/CD178+
- c) Expresión de caspasa 3 activa

Figura 9. Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos T cooperadores.

- a) Expresión de CD183+/CXCR3+.
- b) Expresión de CD184+/CXCR4+.

Figura 10. Número y frecuencia de linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) en los diferentes grupos.

Figura 11. Frecuencia de células viables en los diferentes grupos.

Figura 12. Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos T citotóxicos.

- a) Frecuencia de linfocitos que expresan CD25/IL-2Ra.
- b) Frecuencia de linfocitos que expresan CD69/AIM.

c) Frecuencia de linfocitos que expresan CD314/NKG2D.

Figura 13. Expresión de moléculas efectoras sobre los linfocitos T citotóxicos.

- a) Frecuencias de linfocitos que expresan granzima B.
- b) Frecuencia de linfocitos que expresan perforina.

Figura 14. Expresión de moléculas de muerte celular sobre los linfocitos T citotóxicos.

- a-b) Frecuencia de linfocitos que expresan el receptor de Fas/CD95+ y ligando de Fas/CD178+.
- c) Frecuencia de linfocitos que expresan TRAIL/CD253+.
- d) Expresión de caspasa 3 activa.

Figura 15. Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos T citotóxicos.

- a-b) Frecuencia de linfocitos que expresan CD183+/CXCR3 y CD184/CXCR4+.

Figura 16. Número y frecuencia de linfocitos NK (CD3-CD56+) en los diferentes grupos.

Figura 17. Frecuencia de células NK viables en los grupos.

Figura 18. Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos NK.

- a) Frecuencia de células que expresan CD25+/IL-2Ra.
- b) Frecuencia de linfocitos que expresan CD69+/AIM.
- c) Frecuencia de linfocitos que expresan CD314+/NKG2D.

Figura 19. Expresión de moléculas efectoras sobre los linfocitos NK.

- a) Frecuencia en la expresión de granzima B.
- b) Frecuencia en la expresión de perforina.

Figura 20. Expresión de moléculas de muerte sobre linfocitos NK.

- a-b) Frecuencia de linfocitos que expresan el receptor/CD95+ y ligando de Fas/CD178+.
- c) Frecuencia de linfocitos que expresan TRAIL/CD253+.
- d) Expresión de caspasa 3 activa.

Figura 21. Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos NK.

- a-b) Frecuencia de células NK que expresan CD183+/CXCR3 y CD184+/CXCR4.

Figura 22. Características fenotípicas de los linfocitos T cooperadores en pacientes con Alcoholismo.

Figura 23. Características fenotípicas de los linfocitos T cooperadores en pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

Figura 24. Características fenotípicas de los linfocitos T citotóxicos en pacientes con alcoholismo.

Figura 25. Características fenotípicas de los linfocitos T citotóxicos en pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

Figura 26. Características fenotípicas de los linfocitos NK en pacientes con alcoholismo.

Figura 27. Características fenotípicas de las células NK en pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

Figura 28. Cambios fenotípicos observados en los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK de pacientes con Alcoholismo.

Figura 29. Cambios fenotípicos observados en los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK de pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

3.2 TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 1. Diseño de paneles para determinar las características de los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK.

Tabla 2. Datos demográficos y de consumo de alcohol en la población de estudio.

Tabla 3. Parámetros celulares en los diferentes grupos.

Tabla 4. Enzimas hepáticas en los diferentes grupos.

Tabla 5. Concentraciones séricas en los grupos de estudio

Tabla 6. Correlaciones de linfocitos T cooperadores.

Tabla 7. Correlaciones de linfocitos T citotóxicos.

Tabla 8. Correlaciones de linfocitos NK.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Consumo de alcohol en el mundo

El alcohol etílico o etanol es una sustancia psicoactiva con propiedades causantes de dependencia, es consumido en todo el mundo y ha sido usado por diversas culturas durante siglos (OMS, 2015; Liangpunsakul, S., *et al*, 2016).

Debido a su consumo excesivo, cada año se producen 3.3 millones de muertes, lo que representa un 5.9 % de todas las defunciones (OMS, 2015) siendo el factor causal de más de 200 enfermedades, trastornos mentales y de conducta, así como accidentes y violencia que impone cargas sanitarias, sociales y económicas a la sociedad (OMS, 2015; Mathurin, P. *et al*, 2015).

El Sistema de Información Global sobre Alcohol y Salud (GISAH, por sus siglas en inglés) reportó en 2010, que el consumo de alcohol per cápita es alto en países desarrollados; sin embargo, se puede encontrar un alto consumo por bebedor en todas las regiones (WHO, 2018), por ejemplo: Europa oriental tiene el mayor consumo per cápita con 15.7 L por persona (8.1 L por mujer y 24.9 L por hombre), mientras que la región de África del Norte / Medio Oriente tuvo el menor consumo de alcohol per cápita por adulto, con 1.0 L por persona (0.2 L por mujer y 1.7 L por hombre) (Liangpunsakul, S., *et al*, 2016; Rehm, J., *et al*, 2013), en comparación con América del Norte donde el consumo promedio es de 6-8 L y de 4 a 6 L en México (Spanagel, R., 2009) (Figura 1).

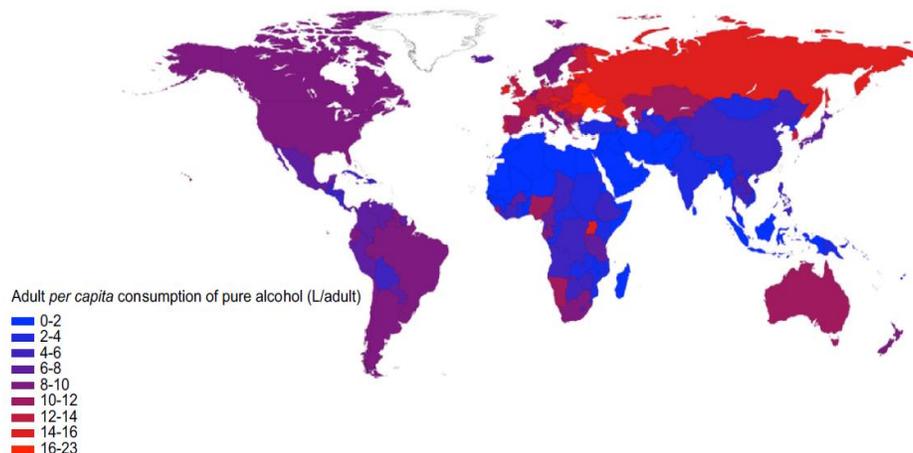


Figura 1. Consumo de alcohol per cápita por adulto en litros de alcohol puro (L/adulto).

El GISHA también establece que por patrón de consumo, en todo el mundo, 62 % de hombres y mujeres se abstuvieron de beber alcohol en los últimos 12 meses, 7.5 % de los bebedores presentan al menos un episodio de consumo excesivo de alcohol por mes y en países como Bielorrusia, Belice, Granada, Guatemala, Kazajstan, México, Namibia, la Federación Rusa, Sudáfrica, Ucrania y Zimbabwe presentan un elevado patrón de riesgo (WHO, 2018).

Cuando se consume alcohol, éste afecta de diferentes maneras y sus efectos son complejos ya que dependen de varios factores separados pero relacionados, como la cantidad que se consume (dependiente del número de bebidas estándar), que tan frecuente (agudo o crónico), la velocidad (en cuanto tiempo se consumen las bebidas), el sexo del consumidor, edad, el sistema u órgano entre otros (Goral, J., et al, 2008; NIAAA, 2017). Si bien no existe un único factor dominante, cuantos más factores converjan en una persona, más probable será que esa persona desarrolle problemas relacionados con el alcohol como consecuencia de su consumo (OMS, 2015).

4.2 Bebida estándar

Una bebida estándar es cualquiera que contenga aproximadamente 14 gramos de alcohol puro (aproximadamente 0.6 onzas líquidas o 1.2 cucharadas) (NIAAA, 2017). (Figura 1)

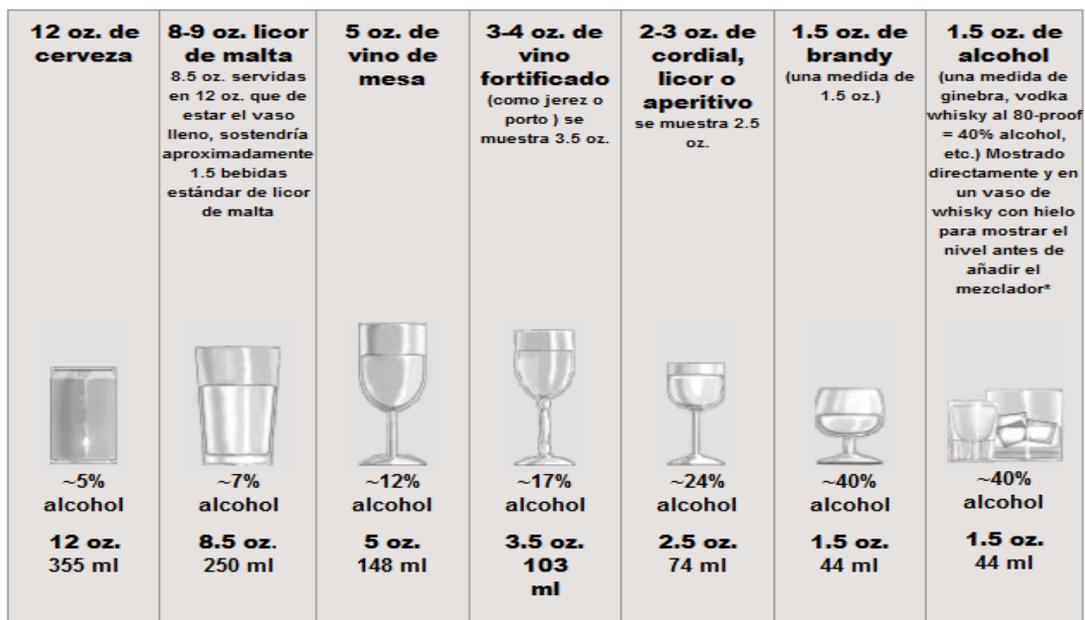


Figura 2. Equivalentes de una bebida estándar según el NIAAA (Medidas en mL aprox.). Tomado de NIAAA.

Desde el punto de vista sanitario tiene mayor relevancia determinar los gramos de alcohol absoluto ingeridos. Para realizar este cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Gramos de alcohol} = (\text{G}^\circ \times \text{ml} \times 0.8) / 100$$

Donde:

G°= Graduación alcohólica de la bebida, la cual se puede visualizar en la etiqueta de la misma.

ml= Cantidad de bebida consumida expresada en mililitros.

0.8= Peso específico del alcohol.

4.3 Patrones de consumo de alcohol

Existe un amplio espectro de definiciones en lo que se refiere al consumo de bebidas alcohólicas, partiendo desde el consumo ligero esporádico y relacionado a eventos sociales, hasta formas de ingesta excesiva como el consumo diario excesivo, así como los episodios repetidos de beber hasta la intoxicación, consumos de alcohol que causan daño físico o mental y el consumo cuyo resultado es el desarrollo de dependencia (alcoholismo).

El consumo de alcohol puede tener un impacto no solo en la incidencia de enfermedades, lesiones y otras condiciones de salud, sino también en el curso de los trastornos mentales y sus resultados en los individuos. Las consecuencias para la salud del consumo de alcohol varían según la extensión y el método de uso (excesivo, agudo o crónico) y depende de numerosos factores ambientales e individuales como: las características demográficas, la cantidad de consumo de alcohol, la frecuencia, la duración, la calidad de alcohol y el patrón de consumo varían entre los consumidores.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) y la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) se pueden apreciar varios tipos de consumo:

Consumo moderado: Definido como el consumo de 1 hasta 2 bebidas estándar por día (14-30 g) para las mujeres y de 2 a 3 bebidas por día (30-40 g) para los hombres (NIAAA, 2017).

El NIAAA acota una definición de *consumo de bajo riesgo*, el cual es definido como el consumo de no más de 3 bebidas estándar en un solo día (40 g) y no más de 7 bebidas por semana (98 g) para las mujeres. En los hombres, se define como el consumo no mayor de 4 bebidas en un solo día (56 g) y no más de 14 por semana (196 g). Investigaciones realizadas por el NIAAA demuestran que alrededor de 2 de cada 100 personas que beben dentro de estos límites, tienen un trastorno por consumo de alcohol.

Consumo de riesgo: Patrón de consumo que aumenta el riesgo de consecuencias adversas para el bebedor o para los demás. Los patrones de consumo de riesgo son importantes para la salud pública a pesar de que el individuo aún no haya experimentado ningún trastorno y se define como el consumo regular diario 2 a 3 bebidas estándar al día (20-40 g) en mujeres, y de 4 a 6 bebidas estándar (40-60 g) en hombres.

Consumo perjudicial o excesivo: Aquel que conlleva consecuencias para la salud física y mental, aunque algunos también incluyen las consecuencias sociales entre los daños causados por el

alcohol. Consumo regular diario de 4 o más bebidas estándar (50 g) en mujeres y de más de 5 bebidas estándar en hombres (70 g) en el último mes (NIAAA, 2017).

Dependencia: Conjunto de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos que aparecen después del consumo repetido de alcohol. Estos fenómenos incluyen deseo intenso de consumir alcohol, dificultad para controlar el consumo, persistencia del consumo a pesar de las consecuencias perjudiciales, mayor prioridad al consumo frente a otras actividades y obligaciones, aumento de la tolerancia al alcohol y abstinencia física cuando el consumo se interrumpe. Generalmente implica ingesta diaria de alcohol mayor a 50 g en mujeres y 70 g en hombres por al menos 5 años consecutivos.

El NIAAA y la ENCODAT incluyen dos categorías más de consumo, denominadas *Binge Drinking* o *Consumo consuetudinario*:

Binge Drinking: Definido como un patrón de consumo que eleva los niveles de concentración de alcohol en la sangre (BAC) a 0.08 g/dL. Esto generalmente ocurre después de consumir 4 bebidas para mujeres y 5 bebidas para hombres, en aproximadamente 2 horas (NIAAA, 2017).

Consumo consuetudinario: Aquellas personas que por lo menos una vez a la semana consumen 5 bebidas estándar o más en una sola ocasión en el caso de los hombres, o 4 bebidas o más en una sola ocasión para las mujeres (ENCODAT, 2017).

4.4 Consumo de alcohol en México

En la actualidad el alcohol constituye la principal droga de adicción. De acuerdo a informes de la OMS, el alcohol se encuentra entre los tres primeros factores de riesgo de enfermedades en países como México y a su vez las afecciones por el consumo de alcohol figuran entre los 10 primeros trastornos de importancia (OMS, 2003).

En México, la 4ª causa de mortalidad está relacionada con enfermedades del hígado, particularmente aquellas que están relacionadas directamente con el consumo de alcohol como la Enfermedad Hepática Alcohólica (EHA) donde hubo 14,176 defunciones. De acuerdo al sexo, en hombres ocupa la 5ª causa con 12,999 defunciones y en mujeres la 6ª con 1,175 en 2017. Otra enfermedad que se encuentra dentro de las primeras 20 causas de mortalidad en los hombres es el síndrome de dependencia alcohólica reportándose 2,215 defunciones durante el 2017 (INEGI, 2017).

De acuerdo a la ENCODAT 2017, el consumo de alcohol entre la población de 18 a 65 años, fue mayor que en los adolescentes y sigue en aumento desde el 2002. La prevalencia de consumo de

alcohol alguna vez en la vida fue de 77.3 % y el consumo durante el último año fue de 53.3 %, en tanto, el consumo en el último mes incrementó a 39.9 % y el consumo diario aumentó hasta 3 % siendo mayor en los hombres (5 %); de acuerdo al consumo consuetudinario este incremento hasta el 9.3 % con respecto a 2011 (ENCODAT, 2017).

La cerveza sigue siendo la bebida de preferencia de la población mexicana, más de la mitad de la población masculina la consume (53.6 %) y una tercera parte de la población femenina (29.3 %), en segundo lugar se encuentran los destilados (23.6 %), en tercero los vinos de mesa (6.6 %), las bebidas preparadas (4.4 %) y por último el aguardiente y el alcohol de 96° (ENA, 2011; ENCODAT, 2017).

En cuanto al consumo per cápita, la población mexicana reporta ingerir 4.9 litros de alcohol puro, de acuerdo al sexo los hombres consumen en promedio 7.9 litros y las mujeres 2.1 litros. Por rango de edad el grupo de 18 a 29 años es el que presenta el consumo per cápita más elevado 7.6 litros, mientras que en aquellos de más de 40 años el consumo se reduce hasta 2.5 litros. Los estados de Aguascalientes (8 L), Jalisco (7.9 L) y Nuevo León (7.4 L) reportan mayor consumo per cápita en comparación con el consumo nacional.

De los consumidores de alcohol en el último año, cerca de 700 mil personas han acudido a tratamiento (2.2 %), mientras que los consumidores que presentan dependencia en el último año, la cifra disminuyó a 262,053 personas (14 %). De acuerdo al sexo, las mujeres asisten menos a recibir tratamiento en comparación con los hombres (0.5 % y 3.2 %). Por tipo de tratamiento recibido por consumidor con dependencia en el último año, se ha observado que la mayoría han estado en un anexo (32.4 %), tratamiento por desintoxicación (24.8 %) y por tratamiento psiquiátrico menos del 10 %.

Al analizar las necesidades de atención por el consumo de alcohol para la población, los datos indican que el 2.2 % de los usuarios con dependencia y 4 % de los que abusan del alcohol requieren algún tipo de ayuda o intervención, es por esto que es de suma importancia promover campañas de prevención, promoción e información en la población mexicana.

4.5 Enfermedad Hepática Alcohólica

La Historia Natural de la Enfermedad Hepática por Alcohol (EHA) incluye varios escenarios entre los que se encuentran la esteatosis (hígado graso), la esteatohepatitis (hígado graso e inflamación), incluida la hepatitis alcohólica (HA), fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) (Gao, B., Bataller, R., 2011). Estas etapas no son necesariamente distintas sino más bien, son múltiples etapas que pueden estar presentes simultáneamente en un individuo (O'Shea, R. S., *et al*, 2010).

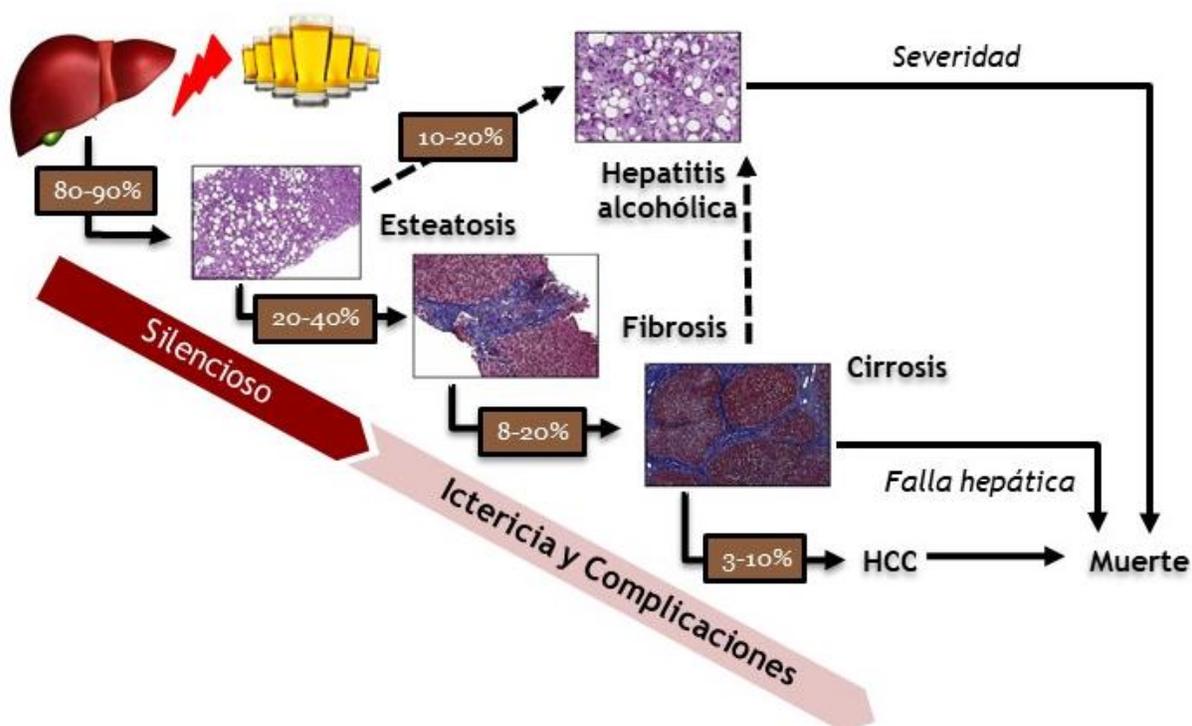


FIGURA 3. Historia Natural de la EHA. Tomado y modificado de Mathurin, P., Bataller, R., 2015.

4.5.1 Esteatosis hepática

La esteatosis hepática es una respuesta temprana al consumo de alcohol que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa en los hepatocitos, principalmente triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol (Gao, B., Bataller, R., 2011; Theise N. D., 2013). Se desarrolla aproximadamente del 80-90 % de las personas que beben más de 60g al día de alcohol pero también hay personas que son susceptibles a desarrollarlo con una menor cantidad (Nagy, L.E., 2015). El hígado graso alcohólico, es asintomático, no tiene complicaciones y se reporta que es completamente reversible con la abstinencia después de 4-6 semanas (O'Shea, R. S., *et al*, 2010).

Aunque la esteatosis “pura” se considera clínicamente benigna, la acumulación excesiva de grasa propicia a que los hepatocitos sean vulnerables al ataque del “segundo golpe” generado por el estrés oxidativo, así como a la secreción de citocinas pro-inflamatorias lo que conlleva a la progresión hacia esteatohepatitis (Wang, Z. G. *et al*, 2016). Los hepatocitos que se ven afectados son los de la zona 3 (perivenular), aunque también puede afectar a los hepatocitos de la zona 2 y 1 (periportal) cuando el daño es mayor (Gao, B. & Bataller, R., 2011).

Los primeros estudios indican que el consumo de alcohol aumenta el suministro de lípidos al hígado desde el intestino delgado, lo que aumenta la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo y la absorción de estos por el hígado; sin embargo, la contribución de estos mecanismos durante el desarrollo del esteatosis después del consumo de alcohol a largo plazo aún no es clara (Wang, Z. G. *et al*, 2016; Gao, B. & Bataller, R., 2011).

A nivel metabólico se sabe que el consumo de alcohol aumenta la proporción de Nicotina Adenina Dinucleótido (NAD⁺) / Nicotina Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) en los hepatocitos. Estudios recientes indican que la exposición al alcohol, regula los factores asociados al metabolismo lipídico, estimulando la lipogénesis e inhibiendo la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, principalmente a través de la inactivación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR) que controla la transcripción de una variedad de genes implicados en el transporte de ácidos grasos libres y la oxidación (Res, C. & Kaser, S., 2016).

También se conoce que el etanol aumenta la síntesis de ácidos grasos en los hepatocitos mediante la regulación positiva de la proteína 1c de unión a los elementos reguladores del estero (SREBP-1c), factor de transcripción que promueve la síntesis de ácidos grasos a través de la regulación positiva de genes lipogénicos. Por lo que el consumo de alcohol, podría aumentar directamente la transcripción del gen SREBP-1c a través del acetaldehído o regularla indirectamente activando procesos y factores que estimulan su expresión como la respuesta del retículo endoplásmico al estrés celular. Se ha demostrado que la inhibición de SREBP-1c en ratones reduce el hígado graso inducido por el etanol, lo que explica su papel (Res, C. & Kaser, S., 2016; Osna, N. A. *et al*, 2017).

4.5.2 Esteatohepatitis

La esteatohepatitis está caracterizada por esteatosis centrilobular, balonamiento de los hepatocitos, cuerpos de Mallory, fibrosis perivenular, fibrosis pericelular e infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y linfocitos, lo anterior es importante debido a que es un prerrequisito para la progresión a fibrosis y cirrosis (Theise N. D., 2013; Marsano L. S., *et al*, 2016). El mecanismo molecular de progresión de esteatosis a esteatohepatitis involucra interacciones complicadas entre los efectos directos de los metabolitos tóxicos del etanol sobre los diferentes

tipos celulares en el hígado, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y la respuesta inflamatoria sobreactivada.

El acetaldehído, producto del metabolismo del etanol en el hígado, juega un papel importante en el desarrollo de la esteatohepatitis alcohólica. Es un compuesto reactivo y altamente tóxico para los hepatocitos ya que se une tanto a proteínas como al ácido desoxirribonucleico (DNA), lo que conduce no solo a sus cambios funcionales, sino también a la activación del sistema inmune adaptativo y a la infiltración de células inmunitarias en el tejido dañado.

El estrés oxidativo genera un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad antioxidante celular, se cree que juega un papel crítico en la transición de esteatosis simple a esteatohepatitis. Muchas vías se han sugerido que contribuyen a la aparición de estrés oxidativo en respuesta a la exposición crónica al etanol (Galicia, M. & Gutiérrez, G., 2014).

En los hepatocitos, la activación del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y el daño mitocondrial parecen desempeñar un papel central en la inducción del estrés oxidativo celular. CYP2E1 es altamente inducible y presenta una alta actividad catalítica para el etanol, durante su ciclo catalítico, genera una cantidad significativa de ERO, que posteriormente puede provocar daño celular, lipoperoxidación lipídica y daño mitocondrial (Galicia, M. & Gutiérrez, G., 2014; Ceni, E., *et al*, 2014).

Los efectos perjudiciales del consumo crónico de alcohol sobre la mitocondria han sido bien documentados. La exposición a largo plazo está asociada con una actividad reducida de las enzimas clave en la cadena respiratoria mitocondrial y una disminución de la utilización de oxígeno por las mitocondrias. El alcohol también conduce a la ruptura entre el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones, lo que conduce a una producción elevada de anión superóxido (O_2^-) (Ceni, E., *et al*, 2014).

Además, el consumo crónico de alcohol está asociado con el daño de la membrana mitocondrial, posiblemente debido a la acumulación de acetaldehído, lo que conduce a una absorción defectuosa de glutatión (GSH), que sensibiliza a los hepatocitos a la muerte celular inducida por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (Galicia, M. & Gutiérrez, G., 2014)

Además de los hepatocitos, se identificó la activación de las células de Kupffer (CK) como un elemento central en el desarrollo de la esteatohepatitis.

La exposición crónica al alcohol resulta en el sobrecrecimiento de bacterias gram-negativas lo que propicia el aumento de la permeabilidad intestinal, lo que lleva a la traslocación de lipopolisacárido (LPS) desde la luz intestinal hacia la circulación portal. El aumento de LPS circulante induce la activación de las CK en el hígado, ya que interactúa con el receptor tipo Toll

4 (TLR-4), lo que resulta en la producción de estrés oxidativo y citocinas pro-inflamatorias, incluido TNF- α , el cual desempeña un papel fundamental en la muerte del hepatocito (Stickel, F., *et al*, 2017).

4.5.3 Fibrosis/Cirrosis

La fibrosis hepática es una respuesta de cicatrización al daño hepático crónico. Se caracteriza por el depósito excesivo de colágena y otras proteínas de matriz extracelular, principalmente las derivadas de la activación de células estelares (HSC). Los principales estímulos para la activación de las células estelares durante el consumo crónico de alcohol, incluyen al acetaldehído y las citocinas pro-inflamatorias producidas por las células de Kupffer en respuesta al LPS, a través de interacciones con su receptor (Wang, Z. G. *et al*, 2016).

La activación crónica repetida de la respuesta conduce al mal funcionamiento del tejido y a la progresión rápida a cirrosis (la fase más avanzada de la fibrosis) en la mayoría de pacientes ocurriendo después de un intervalo de 15 a 20 años (Friedman SL, 2008). La cirrosis puede llevar a complicaciones graves relacionadas con la hipertensión portal, ascitis, falla renal, encefalopatía y sangrado de várices esofágicas (Toosi, A. E., 2015; Bataller, R. & Brenner, D. A., 2005; Pinzani, M., 2015).

Aunque la cirrosis es el resultado común de la fibrogénesis progresiva hay distintos patrones de desarrollo fibrótico relacionado con la enfermedad subyacente causante de la fibrosis. Diferentes patrones de evolución profibrogénica han propuesto diferentes fases: 1. La localización topográfica del daño tisular, ocasionada por la lesión primaria 2. La concentración relativa de factores profibrogénicos y fibrinolíticos debido a la activación de las células efectoras, 3. Los mecanismos fibrogénicos prevalentes que producirán la Matriz Extracelular (MEC) que se empalma con 4. Deposición dinámica e insuficiente reabsorción de la MEC lo que promueve la progresión a fibrosis (Pinzani, M., 2015, Rockey, D. C., *et al*, 2015). Además, estos patrones diferentes implican la participación de diferentes efectores celulares del proceso fibrogénico que se resumen en 3 principales grupos: 1. Activación cónica de la reacción de cicatrización 2. Mecanismos moleculares relacionados con el estrés oxidativo y 3. El desarreglo de la llamada interacción epitelio mesénquima conduciendo a la generación de colangiocitos reactivos y fibrosis peribiliar (Pinzani, M., 2015).

La fibrosis hepática es el resultado de la cicatrización del hígado a lesiones repetidas, pero no sólo implica la formación de cicatriz, sino también involucra la distorsión del parénquima hepático debido a la formación de septos, nódulos además de la alteración de la arquitectura vascular (Friedman, S. L., 2008) y la pérdida de equilibrio entre la regeneración y la reparación (Lee, U. E. & Friedman, S. L., 2011). Después de un daño agudo, las células del parénquima regeneran y

reemplazan a las células necróticas o apoptóticas. Este proceso está asociado con la respuesta inflamatoria y la deposición de MEC. La distribución del material fibrótico depende del origen del daño hepático, en el daño inducido por el consumo crónico de alcohol se localiza en áreas pericentrales y perisinusoidales.

Durante el desarrollo de fibrosis se produce una interacción compleja entre diferentes tipos de células así como componentes de la MEC para encapsular la lesión (Toosi, A.E., 2015; Friedman, S. L., 2008).

4.6 Factores asociados a la Enfermedad Hepática Alcohólica

4.6.1 Edad

No está completamente claro cómo la edad modifica la progresión de la EHA, personas de todas las edades beben; sin embargo, la edad se considera un predictor de daño (Masson, S., *et al*, 2014) ya que la mayoría de las personas que ingresan en hospitales y presentan EHA tienen entre 45 y 64 años. También se conoce que los adultos mayores de 65 años son más vulnerables y una alta proporción de ellos cumplen con los criterios para el abuso y dependencia del alcohol además de mostrar mayor grado de deterioro inducido por el consumo de etanol que las personas jóvenes (Osna, N. A., *et al*, 2015; Schwartz, J. M. & Reinus, J. F., 2012).

4.6.2 Género

Los datos epidemiológicos muestran que las mujeres son más susceptibles al daño hepático generado por el alcohol que los hombres debido a las bajas concentraciones de alcohol deshidrogenasa gástrica lo que disminuye la capacidad para oxidar el alcohol, este déficit permite que haya una cantidad mayor de etanol en la circulación del portal, exponiendo al hígado a una concentración más alta de alcohol. En las mujeres se encuentra una alta proporción de grasa corporal y posiblemente también exista algún efecto de los estrógenos (Schwartz, J. M. & Reinus, J. F., 2012; Mumenthaler, M. S. *et al*, 1999; Osna, N. A. *et al*, 2015).

4.7 Diagnóstico

El diagnóstico de EHA se basa en una combinación de características, que incluye: 1) Historia de ingesta de alcohol; 2) Evidencia clínica de la enfermedad hepática; 3) Pruebas de laboratorio y técnicas no invasivas. Desafortunadamente, la capacidad para detectarlos está limitada por los factores del paciente y el médico, así como las deficiencias del laboratorio de diagnóstico.

En pacientes con EHA temprana, los estigmas de abuso de alcohol como la pérdida de músculo, desnutrición, signos de neuropatía periférica pueden estar presentes, pero a menudo los pacientes son totalmente asintomáticos por lo que los médicos subestiman los problemas relacionados con el consumo de alcohol, en este punto los hallazgos físicos como la evidencia del laboratorio no pueden ser utilizados como diagnósticos. Por lo tanto, el clínico debe tener un umbral bajo para plantear el problema de una posible EHA y debe confiar en la evidencia indirecta de abuso de alcohol, como cuestionarios, información de miembros de la familia o pruebas de imagen para fortalecer o confirmar su sospecha clínica.

La historia de ingesta de alcohol ofrece datos aproximados del patrón de consumo, es decir, la frecuencia del consumo, la cantidad y la velocidad del alcohol ingerido, así como las consecuencias sociales o psicológicas del abuso de alcohol, en general el médico no puede controlar y, por lo tanto, es difícil reconocer y tratarlo de forma adecuada. Es por esto, que echan mano de diversas herramientas como cuestionarios para detectar la dependencia, el abuso, así como el riesgo que presenta el consumo de alcohol en el individuo como el cuestionario CAGE (Cut down, Annoyed, Guilty, Eye opener) que detecta bebedores rutinarios, la Prueba de detección de Alcoholismo de Michigan (MAST, por sus siglas en inglés), la Prueba de Identificación de Trastornos por el Uso del Alcohol (AUDIT). El uso de una entrevista estructurada utilizando estos instrumentos permite conocer el consumo de alcohol de por vida.

El examen físico en pacientes con EHA puede variar desde lo normal hasta aquellos que sugieren cirrosis avanzada. Aunque las características del examen físico generalmente tienen una sensibilidad baja, incluso para la detección de cirrosis las características específicas de EHA son difíciles de identificar.

Algunas de las características del examen físico también pueden llevar alguna información de pronóstico independiente, con la presencia de características específicas asociadas con un mayor riesgo de mortalidad en 1 año.

Estos incluyen (con sus riesgos relativos asociados): encefalopatía hepática, presencia de venas visibles a través de la pared abdominal anterior, edema, ascitis y debilidad.

Aunque esto es algo útil clínicamente, los hallazgos del examen físico deben interpretarse con cautela, porque existe una heterogeneidad considerable en la evaluación de cada una de estas características cuando participan diferentes examinadores.

Debido a que el hígado tiene múltiples funciones (bioquímicas, sintéticas y excretoras) no permiten que un sólo examen de laboratorio o un panel de pruebas sean capaces por completo para valorar dichas funciones. Sin embargo, se cuenta con algunas pruebas específicas y sensibles que valoran estrictamente su funcionamiento y se utilizan como marcadores de daño. Estas pruebas son: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y la γ -

Glutamilttransferasa (GGT), albúmina, tiempo de protrombina, factores de coagulación y bilirrubinas. Otras pruebas de laboratorio como el Volumen Corpuscular Medio (VCM), hemoglobina y el recuento de plaquetas también son utilizadas.

Los estudios de imagen se han utilizado para diagnosticar la presencia de EHA, pero no tienen un establecimiento del alcohol como etiología específica. Sin embargo, el diagnóstico se puede sugerir mediante ecografía, Tomografía Computarizada (TC) o por Imagen por Resonancia Magnética (IRM).

4.8 Tratamiento

El tratamiento de la EHA está basado en la etapa de la enfermedad en que se encuentre el paciente, siendo la abstinencia la intervención terapéutica más importante ya que se ha demostrado que mejora el resultado y las características histológicas de la lesión hepática, ya que reduce la presión portal, la progresión a cirrosis y mejora la supervivencia en todas las etapas.

La reincidencia es un riesgo importante en todos los pacientes y puede suceder en cualquier momento después de la abstinencia. Por esto, se han probado varios medicamentos para ayudar a sostener la abstinencia, uno de los primeros agentes utilizados fue el disulfiram aprobado por la FDA en 1983, sin embargo, una revisión concluyó que había poca evidencia de que el disulfiram mejore la abstinencia y debido a su poca tolerabilidad, su uso ha sido suplantado por otros medicamentos.

La naltrexona, antagonista opioide que controla el deseo del consumo de alcohol fue aprobado en 1995 para el tratamiento del alcoholismo, aunque también se ha demostrado que causa daño hepatocelular. Sin embargo, una revisión sistemática reportó que el uso de naltrexona y nalmefeno en 29 ensayos clínicos aleatorizados concluyó que el tratamiento a corto plazo reduce el riesgo de recaída.

El acamprosato reduce los síntomas de abstinencia, incluido el deseo de tomar alcohol pero no se conocen sus efectos sobre la supervivencia. En los alcohólicos desintoxicados, se ha demostrado que disminuye la tasa de recaída, mantiene la abstinencia y disminuye la severidad de la recaída, cuando ocurre.

4.9 Sistema inmune y consumo de alcohol

Los resultados obtenidos en diversos estudios establecen que el abuso del alcohol, el “binge drinking”, el consumo moderado o excesivo, pero sobre todo el consumo crónico, están asociados con pérdida de la inmunocompetencia, donde se ve afectada tanto la inmunidad innata como la

adaptativa. Esta pérdida puede ser parcialmente responsable del aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas y tumores (Zhang, H., *et al*, 2015). Estos cambios en el sistema inmune incluyen pérdida o redistribución de las células de sangre periférica, del bazo, los ganglios periféricos, el timo y la médula ósea, lo que genera un desbalance entre las subpoblaciones linfocitarias; aunque se ha reportado que la mayoría de las células que se pierden del bazo parecen ser células B y células T. Otros estudios sugieren que las células que disminuyen son las células mononucleares. Sin embargo, aún se desconoce la razón de este desbalance, lo cual no solo es importante a nivel de la defensa inmune, sino que también puede tener un efecto sobre el hígado. Lo anterior ha sido determinado en humanos y en diferentes modelos animales (Arteel, G., 2008; Goral, J. *et al*, 2008; Helm, R. *et al*, 1996; Jerrels, T. R. *et al*, 1992).

4.9.1 Inmunidad Innata

La respuesta del sistema inmune innato a una infección, a una lesión aguda o crónica se manifiesta como inflamación, esta respuesta está disponible de inmediato pero no es específica. El propósito de la inflamación es contener la infección permitiendo el acceso rápido de las células inmunes hacia el sitio de la infección además de promover la restauración una vez que el patógeno ha sido eliminado. Este proceso involucra múltiples citocinas y células inmunes. Dentro de las células inmunes innatas se encuentran las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos, los monocitos/macrófagos y las células dendríticas (CD) que expresan receptores de reconocimiento de patrones (RRP) los cuales, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) como el LPS. La mayoría de estas células son fagocitos: células que ingieren a otras o desechos celulares a través de la fagocitosis. La interacción entre RRP y PAMP's activa las células para fagocitar patógenos y secretar citocinas y quimiocinas, lo que resulta en una respuesta inflamatoria y la movilización de las células inmunes hacia el sitio de infección. Además, los monocitos procesan y presentan péptidos derivados de antígenos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie celular a linfocitos T vírgenes activándolos e iniciando la respuesta inmune adaptativa (Barr, T. *et al*, 2016; Spiering, M.J., 2015; Murphy, K., *et al*, 2009).

Los mecanismos de activación de la inmunidad innata durante el consumo del alcohol incluyen la hepatotoxicidad directa, la producción de EROs y el estímulo de las CK para la posterior producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , citocinas hepatoprotectoras como IL-6 y anti-inflamatorias como IL-10, lo que desempeña un papel compensatorio en la mejora de EHA. Se sabe que el consumo crónico de alcohol aumenta la permeabilidad intestinal, lo que resulta en concentraciones elevadas de LPS el cual, activa las CK para producir EROs y el TNF- α mediante vías independientes de MyD88 y dependientes de TRIF, lo que lleva a la inflamación y daño del hígado.

4.9.1.1 Células NK

Las células NK son linfocitos grandes con abundantes gránulos citoplasmáticos, que tienen la capacidad de reconocer o eliminar células anormales como las tumorales o infectadas por virus, sin la necesidad de inmunización o activación previa.

Esto se debe a su capacidad destructora que puede ser directa, dada por la liberación de gránulos citolíticos hacia la superficie de la célula blanco unida, donde las proteínas efectoras que contienen penetran en la membrana celular e inducen apoptosis, o la mediada por anticuerpos, gracias a la presencia del receptor CD16 en su membrana (Murphy, K., *et al*, 2009; Batallas, Z. K. *et al*, 2012).

De cualquier modo, la muerte por linfocitos citolíticos se desencadena por receptores invariables que reconocen componentes en la superficie de las células infectadas y su función en la defensa yace en las fases tempranas de infección (Murphy, K., *et al*, 2009).

Fenotípicamente las células NK se pueden identificar como linfocitos CD3-, CD56+, CD16+, marcadores que definen este grupo celular (Gao, B., *et al*, 2009).

Las células NK juegan un papel fundamental en el paso de una respuesta inmune innata a una adquirida, ya que intervienen regulando otras poblaciones celulares, así como en la maduración de otras células (Murphy, K. *et al*, 2009).

A nivel sistémico, se ha demostrado tanto en humanos como en ratones que el consumo crónico de alcohol reduce la cantidad de células NK en periferia, provocando baja actividad citotóxica y un desbalance entre las subpoblaciones linfocitarias (Szabo, G., 1999; Zhang, H. & Meadows, G. G., 2008). Se desconoce la razón de este desbalance pero se sugiere que puede suceder por disminución en la generación de timocitos (Cook, R. T., *et al*, 2007) y/o por apoptosis de los linfocitos (Alhomsy, K., *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) y ha recibido mucha atención en el pasado, ya que varios estudios independientes destacaron su papel antifibrótico (Radaeva, S., *et al*, 2006), en particular, las células NK son capaces de detectar e inducir apoptosis en las HSC activadas. Recientemente, se demostró que el consumo crónico de etanol atenúa los efectos antifibróticos de las células NK en el hígado (Jeong, W. I., *et al*, 2008), con lo cual se explica la participación del etanol en la aceleración de la fibrosis hepática.

4.9.2 Inmunidad Adaptativa mediada por células T

La respuesta inmune adaptativa se distingue de la inmunidad innata por la capacidad de general memoria inmunológica o inmunidad protectora contra la enfermedad (Murphy, K., *et al*, 2009).

Esta respuesta implica la proliferación de células T específicas de antígeno, la memoria inmunológica, la activación de células B y la producción de anticuerpos inmunitarios siendo todos componentes de defensa antimicrobiana eficaz del huésped para la eliminación de patógenos y la protección del mismo contra futuras infecciones.

Sin embargo, este complejo proceso puede verse perturbado por los efectos moduladores del alcohol sobre los diferentes componentes celulares de sistema inmune innato y adaptativo. Estos efectos moduladores, se producen no solo en individuos adultos o modelos animales, sino que también pueden modular las funciones de las células inmunes.

Las células que comprenden el sistema inmune adaptativo son las células T que expresan el co-receptor de células T CD4+, conocidas como células T cooperadoras y desempeñan un papel crítico en la activación y maduración de monocitos, células T citotóxicas y células B.

Las células T CD8+ o células T citotóxicas que eliminan las células infectadas con patógenos intracelulares, así como células tumorales o bajo estrés celular.

4.9.2.1 Células T Citotóxicas

Son células encargadas de las funciones efectoras de la inmunidad celular, mediante la interacción péptido-complejo principal de histocompatibilidad tipo I (CMH-I); reconocen células infectadas por patógenos o células dañadas o anormales, cuando un virus o patógeno infecta a una célula o se vuelve cancerosa, los fragmentos de proteínas dañadas se transportan hacia la superficie celular y se presentan en el CMH- I. Una célula cuyo receptor se ajusta a un antígeno presentado en CMH-I se une al antígeno, lo que resulta en la activación celular. Las células T citotóxicas activadas comienzan a proliferar en células T de memoria que contribuye a la memoria inmunológica o efectoras. Las células T citotóxicas efectoras destruyen a la célula blanco y segregan una serie de moléculas como perforinas y granzimas, que van a conducir a su apoptosis.

4.9.2.2 Células T Cooperadoras

Células que se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune, que es coordinada mediante la interacción péptido-complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CHM-II). Cuando se activan los linfocitos CD4+ se especializan, diferenciándose a su vez en linfocitos efectores, los cuales se van a distinguir por el tipo de citocinas que producen:

Th1: Que migran a los tejidos infectados y colaboran en la activación de los macrófagos, ya que los Th1 segregan INF- γ ; los Th1 son importantes en la defensa frente a los microorganismos intracelulares y la inflamación.

Th2: Que permanecen sobre todo en los tejidos linfoides y colaboran en la activación de los linfocitos B; estos segregan principalmente IL-4 e IL-5. Los Th2 son importantes en las reacciones alérgicas y en la defensa frente a parásitos.

Th17: Denominadas así porque segregan IL-17, además de IL-22; son los principales mediadores de las reacciones alérgicas y parecen estar implicados en el desarrollo de diferentes enfermedades como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal.

La diferenciación en alguno de estos tres tipos celulares no es al azar, sino que va a depender de los estímulos que reciba el linfocito CD4 cuando contacte un antígeno.

Linfocitos T de memoria: Son células generadas después de la activación de los linfocitos T, por exposición a un antígeno extraño (patógeno). Tienen periodo de vida largo, son funcionalmente activos pudiendo circular durante meses o años manteniéndose preparados para responder a nuevas exposiciones del mismo antígeno.

Linfocitos T reguladores: Son células que inhiben las respuestas inmunológicas secretando citocinas inmunodepresoras como IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). También se han asociado con la eliminación de la inmunidad mediada por células al final de las reacciones inmunes, así como en la eliminación de células auto-reactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo (Gershwin, M., *et al*, 2007).

4.9.3 Muerte celular

Apoptosis es un proceso fisiológico normal que ocurre durante el desarrollo embrionario así como para mantener la homeostasis tisular. Es caracterizado por ciertas características morfológicas incluidas la pérdida de asimetría y unión de la membrana plasmática, la condensación del citoplasma y núcleo. La pérdida de la asimetría de la membrana plasmática es una de las principales características.

4.9.3.1 Apoptosis por translocación de fosfatidil serina

En las células apoptóticas, el fosfolipidofosfatidilserina localizado en la membrana celular es translocado de la cara interna a la cara externa, exponiendo la fosfatidilserina al microambiente

extracelular. Anexina V es una proteína de unión a los fosfolípidos dependiente de calcio y que tiene afinidad por la fosfatidilserina, sirve como una prueba para el análisis por citometría de flujo de células sometidas a apoptosis (Zembruski, N.C., *et al*, 2012).

La externalización de fosfatidilserina puede ocurrir en varios estadios de apoptosis, Anexina V puede identificar apoptosis en estadio temprano y/o tardío, aunque es típicamente usado en conjunción con un colorante de ácidos nucleicos como: Ioduro de propidio (PI) o 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) que permiten identificar:

- 1) Células viables o no apoptosis (Anexina V-/7AAD-).
- 2) Células con apoptosis temprana o integridad de membrana presente (Anexina V+/7AAD+).
- 3) Células con apoptosis tardía, muertas o necróticas (AnexinaV+/7AAD+).

Las células viables con membrana celular intacta excluyen al colorante de ácidos nucleicos, mientras que las células con la membrana dañada y muertas son permeables. Esta prueba no distingue entre células que sufren apoptosis versus de aquellas que muestran que mueren por necrosis, puesto que las células son Anexina V+/7AAD+.

4.9.3.2 Receptor de Fas (APO-1/CD95) y ligando de FAS (CD178)

Es una proteína que consta de 2 isoformas, la primera anclada a la membrana (mFas) y soluble (sFas), mientras que mFas induce la apoptosis celular, sFas induce eficazmente la apoptosis en algunas células que expresan mFas (Marsik, C., *et al*, 2003).

La isoforma de membrana, es un receptor transmembrana tipo I de 45-48 kDa que pertenece a la familia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La porción citoplásmica de CD95 contiene un dominio de ~88 aminoácidos denominado “Dominio de Muerte” (DD) que desempeña un papel crucial en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular a vías intracelulares. La DD no posee actividad enzimática, a diferencia de otros receptores transmembrana, ya que media la señalización a través de las interacciones proteína- proteína.

Fas ligando es una proteína transmembrana de tipo II de 40 kDa que es homóloga al TNF, se expresa predominantemente en las células T activadas y en las células NK; además, funciona como una molécula efectora citotóxica de las células T CD8. El ligando puede ser escindido de la membrana celular por una metaloproteasa. Éste induce eficazmente la apoptosis en células que expresan altos niveles de Fas sobre la superficie celular.

Tras la unión del ligando con el receptor de Fas el complejo se agrupa, el dominio de muerte de CD95 interactúa con otros dominios formando FADD, que a su vez interactúa con otros dominios efectores de muerte (DED). En este punto se forma un complejo de señalización que induce la

muerte llamado DISC, que es compuesto por CD95, FADD y procaspasa-8. La formación de DISC da como resultado la interacción de los DED de pro-caspasa 8, pro-caspasa 10 y las isoformas cFLIP, lo que lleva a su activación autoproteolítica que desencadena la cascada apoptótica.

Se han establecido dos tipos de vías de señalización extrínseca mediada por CD95. En la tipo I se caracteriza por la alta formación de CD95 DISC y caspasa 8 activa, que activa las caspasas efectoras 3, 6 y 7. En las células tipo II, hay menos formación de CD95 DISC que conduce a concentraciones más bajas de caspasa 8 activa por lo que, la señalización requiere una amplificación adicional que implique la escisión de la proteína BID por caspasa 8 para generar BID truncado (tBID). Este fragmento induce las funciones pro-apoptóticas de las mitocondrias al agregar a BAX o BAK, que es seguida por la liberación del citocromo c de las mitocondrias dando como resultado la formación del apoptosoma, seguido de la activación de pro-caspasa 9 que a su vez permite que esta escinda a pro-caspasa 3, 6 y 7.

El receptor de Fas y su ligando no sólo se expresa ampliamente sobre el sistema inmunitario, también se expresa sobre los hepatocitos en pequeñas cantidades, colangiocitos, células estelares activadas y células de Kupffer.

La importancia del receptor de Fas en la homeostasis ha sido estudiada Miyawaki, T. y colaboradores en 1992 estudian sobre diversas poblaciones linfocitarias (CD4+, CD8+ y NK) la expresión de Fas mediante citometría de flujo. Encontraron que el antígeno de Fas fue detectado en una proporción de células T CD4+, CD8+, preferentemente en poblaciones CD45RO+ (memoria o activadas previamente), mientras que su expresión estaba ausente sobre las células NK. Este trabajo apoya la idea de que la expresión del receptor de Fas puede ser crucial para el destino de los linfocitos capacitados.

La expresión del receptor en la fisiopatología hepática por varias etiologías ha sido documentada por observaciones como la realizada por Zwolak, A. y colaboradores 2016 en donde evalúan los cambios en las diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes (CD4+, CD8+) que expresan el receptor de Fas en pacientes con EHA, Cirrosis Biliar Primaria (CBP) y Hepatitis autoinmune (HAI). Observando que en las células T CD4+, CD8+ expresan más CD95+ en los sujetos con enfermedades hepáticas en comparación con el grupo control. En las células CD4+, CD95 se expresa más en sujetos con EHA por lo que esta población puede ser afectada por apoptosis, mientras que en las células CD8+, CD95+ se expresa más en los grupos con CBP y HAI. Estos resultados son confirmados también por los obtenidos por Ogawa, S. y colaboradores, 2000 donde observaron que la expresión de CD95 fue elevada en los linfocitos T CD4+, CD8+ de sangre periférica de pacientes con HAI y pacientes con Hepatitis C (VHC) comparadas contra un grupo control.

Panasiuk, A. y colaboradores en 2009 evalúan la influencia del VHC sobre las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) y su susceptibilidad a la apoptosis en relación con la inflamación hepática y fibrosis. Determinan las poblaciones CD4+, CD8+ y NK en sangre periférica además de las concentraciones séricas de sFas y sFasL. Observando que aumentó la expresión de Fas en las células T CD4+ con el genotipo 1b en contraste con el genotipo 3a del VHC y que esta expresión fue mayor en etapas avanzadas de la enfermedad. También observaron que Fas aumenta su expresión en las células T CD8+ y que la concentración de sFas sérica fue mayor en VHC comparados con el grupo control. Encontraron una asociación entre la concentración de sFasL y la actividad inflamatoria del hígado. La concentración sérica de sFasL se correlacionó positivamente con la IMF del receptor de Fas en células T CD4+ y CD8+. Estos resultados indican que existe una susceptibilidad de las PBMC a la apoptosis, que puede atribuirse al contacto constante de los leucocitos con el tejido hepático inflamado o por la influencia directa del VHC.

4.9.3.3 Ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL)

El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), es similar al ligando de CD95 y TNF- α .

TRAIL es una proteína transmembrana de tipo II que puede ser escindido por las metaloproteasas para producir una forma soluble, que mantiene su actividad biológica. Al igual que el ligando de CD95 y TNF- α , se demostró que induce rápidamente la apoptosis en células susceptibles tras la dimerización de sus receptores y la posterior activación de las caspasas que conducen a la fragmentación del DNA.

El TRAIL en los humanos puede unirse a cinco moléculas receptoras diferentes, solo el receptor TRAIL-1 (DR4) y el receptor TRAIL-2 (DR5) son capaces de transmitir una señal de muerte, mientras el receptor TRAIL-3 (DcR1) y el receptor TRAIL-4 (DcR2) no contienen un dominio de muerte funcional.

Aunque se demostró que TRAIL y sus receptores se expresaban de manera constitutiva mediante una variedad de tipos de células, incluidas las células T específicas de auto-antígenos, la relevancia fisiológica de TRAIL y su posible papel en los procesos inflamatorios no se conocen completamente.

La cascada de señalización de la apoptosis iniciada por el receptor TRAIL depende en gran medida del reclutamiento de moléculas de señalización mediada por interacciones proteína-proteína, formando el complejo DISC. La activación del receptor tras la unión del ligando induce cambios conformacionales, que conducen al reclutamiento de la molécula adaptadora FADD (Dominio de Muerte asociado a Fas) a través de interacciones homólogas. FADD a su vez, puede reclutar a caspasa 8 inactiva a través de DED. Una vez activada la caspasa 8, DISC tiene dos sustratos en la

vía de apoptosis: 1) interacción con pro-caspasa 3 y Bid. La escisión y activación catalítica de la caspasa 3 desencadena directamente la cascada de caspasas, conduciendo finalmente a la apoptosis, mientras que la escisión de Bid enlaza la vía extrínseca mediada por receptor y la vía intrínseca.

Además de la señal apoptótica que puede llevar a cabo TRAIL, también se ha reportado un tipo de señalización que no es apoptótica. Se ha demostrado que TRAIL inicia señales mitogénicas y de supervivencia que incluyen la activación del Factor Nuclear- κ B (NF κ B), la proteína cinasa B (PKB o Akt) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

El estudio de TRAIL depende en gran medida de su potencia en la inducción de apoptosis de la célula blanco y sus posibles efectos secundarios en el tejido normal. Se sabe que en el hígado la muerte de los hepatocitos mediada por TRAIL representa un blanco potencial de la terapia tumoral. Los primeros experimentos que utilizaron la transferencia de células tumorales humanas a ratones con deficiencia inmunitaria revelaron que el tratamiento con TRAIL mostraba actividad anti-tumoral sin mostrar efectos adversos en el tejido.

Además de su participación en el cáncer, TRAIL participa en la regulación del equilibrio del sistema inmunológico ya que es expresado por varias células como las NK, las células T activadas, las células T asesinas naturales (NKT), células dendríticas y los monocitos/macrófagos.

Takeda y colaboradores (2001), informaron que TRAIL se expresa de forma constitutiva en células NK en el hígado, ya que juegan un papel importante en el control de la metástasis hepática a través de los mecanismos basados en TRAIL, y parecen ser bien toleradas por el tejido hepático normal.

Las células NK hepáticas recién aisladas expresan niveles relativamente altos de TRAIL en la superficie celular, lo que parece contribuir a la citotoxicidad mediada contra células tumorales. Se encontró que la neutralización de TRAIL *in vivo* con anticuerpos anti-TRAIL conduce a un aumento de la metástasis hepática. De manera similar, ratones deficientes en TRAIL muestran una capacidad reducida para eliminar el tumor hepático. Estos hallazgos apoyan el papel propuesto de TRAIL como tratamiento específico contra los tumores en la terapia contra cáncer.

En un modelo de síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), los ratones deficientes en FasL y TRAIL muestran linfadenopatía, esplenomegalia además de acumulación de células T CD4 y T CD8 negativas.

Por lo tanto, TRAIL contribuye a la regulación de la tolerancia central mediante la reducción de timocitos reactivos. TRAIL puede afectar la inmunidad adaptativa como consecuencia de la activación y expansión de células T inhibidas.

Los ratones deficientes de TRAIL muestran una mayor frecuencia de células T CD4 que los ratones de tipo salvaje debido a la supresión de la apoptosis, mientras que las células T CD8+ activadas por antígeno se eliminan mediante mecanismos mediados por TRAIL.

De estudios en animales y humanos con infección, TRAIL puede provocar una supresión inmunológica induciendo una muerte masiva de diferentes poblaciones de células inmunitarias. Si de nuevo hay un desafío de infección, los mecanismos supresores dependientes de TRAIL prevendrán la eliminación del patógeno y el animal o humano será sensible a la infección. El bloqueo de TRAIL a través de la administración sistémica de mAb anti-TRAIL, previenen la supresión inmune inducida por patógenos, manteniendo la función inmune mediada por células T para eliminar la infección y aumentar la supervivencia.

La forma correcta de eliminar la infección es a través de una inflamación fuertemente controlada, ya que la inflamación excesiva puede mejorar la patología.

Aquí, informamos que TRAIL producido o expresado por diferentes poblaciones de células NK humanas primarias es funcional, y representa un marcador de diferenciación o activación de estos, y posiblemente otros, leucocitos citotóxicos. Durante la diferenciación, las células NK, secuencial y diferencialmente, utilizan miembros distintos de la familia TNF o exocitosis de gránulos para mediar en la muerte de las células diana. Las células NK CD161 (+) / CD56 (-) fenotípicamente inmaduras median en la citotoxicidad dependiente de la liberación de gránulos, pero no de FASL o dependiente de gránulos, mientras que las células NK CD56 (+) maduras median las dos últimas.

La ayuda proporcionada por los linfocitos T CD4 durante la capacitación de los linfocitos T CD8 confiere una clave de la memoria inmunológica: la capacidad de expansión secundaria después del reencuentro con el antígeno.

Una vez capacitadas las células T CD8 por las células TCD4, adquieren la capacidad de experimentar una segunda ronda de expansión clonal tras la re-estimulación en ausencia de las células T CD4.

Las células T CD8 que se capacitan en ausencia de las células T CD4, pueden mediar funciones efectoras como la citotoxicidad y la secreción de citocinas tras la re-estimulación, pero no se someten a una segunda ronda de expansión clonal.

Estas respuestas tienen características de ser programadas; es decir, son guiadas por señales que se transmiten a las células T CD8 durante la capacitación, que codifican destinos específicos para su progenie.

Ellos estudian el programa de instrucción que gobierna la respuesta secundaria de las células T CD8 y aquí encontramos que estas células experimentan la muerte celular inducida por activación tras la estimulación secundaria. Esta muerte está mediada por TRAIL. Por lo tanto, la regulación de la expresión de TRAIL puede explicar el papel de las células T CD4+ en la generación de memoria de las células T CD8, representando un nuevo mecanismo para controlar las respuestas inmunes adaptativas.

4.9.3.4 Caspasa 3 activa

La apoptosis se puede definir como un proceso coordinado, dependiente de energía y que involucra la activación de un grupo de cistein proteasas denominadas caspasas (en inglés: cysteinyl aspartate-specific proteases) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula (Elmore, S., 2007).

Dentro de este proceso hay una gran cantidad de interacciones proteicas como entrecruzamientos, rupturas, síntesis y degradación, además de un reordenamiento de estructuras celulares, elevando el consumo de energía por parte de la célula, logrando su efectiva degradación para finalmente ser reciclada por parte de otras células.

Se ha reportado que el tiempo que le toma a una célula llevar a cabo este proceso depende de su tipo y características de activación, pero en promedio es de 2 a 3 horas (Elmore, S., 2007). En cultivo celular, la activación de este proceso depende de múltiples factores que estimulan las vías de iniciación por ejemplo, se ha observado que si se presentan alteraciones en los procedimientos de subcultivo en el momento de confluencia celular, se ve afectado el índice mitótico promedio de las células, y posteriormente una activación del proceso apoptótico (Phelan, M., 1998).

Uno de los aspectos más importantes frente a esta dinámica es que la muerte celular no solo puede darse por apoptosis, la muerte celular puede ocurrir por medio de dos vías principales claramente distinguidas en su naturaleza: apoptosis y necrosis (Kerr, J. *et al.*, 1972; Zhivotovsky, B. & Orrenius, S., 2001).

Se ha postulado y comprobado que la necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía, presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática, además hay una clara disfunción en la mitocondria, aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis (Zhivotovsky, B. & Orrenius, S., 2001), el cual liberando todo el material citoplasmático hacia el exterior de la célula, produciendo generalmente fenotipos inflamatorios y necróticos en los tejidos afectados; mientras que el proceso apoptótico establece mecanismos que aseguran que el contenido celular no será liberado, sino encapsulado y luego removido en su totalidad por células fagocíticas (Campisi, J., 2003).

Hay dos tipos principales de vía de iniciación apoptótica: extrínseca e intrínseca (Huerta, S., *et al*, 2007).

La vía de señalización extrínseca que inicia apoptosis se denominó así ya que involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales, se ha descrito que esta vía es iniciada por unión de:

- 1) El ligando de TNF (Factor de Necrosis Tumoral) al receptor de TNF.
- 2) TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) a los receptores DR4 (en inglés: Death Receptor-4) y DR5.
- 3) Fas-L (Ligando sintetasa de ácidos grasos) al receptor Fas.

Se conoce que estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (Dominio de muerte asociado a Fas) o TRADD (Dominio de muerte asociado al receptor TNF), los cuales activan caspasas iniciadoras 8 y 10, activando posteriormente caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, lo que culmina en fenotipo celular apoptótico con características fisiológicas y morfológicas descritas.

En la cascada de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales principalmente por la apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembranal, lo que conlleva una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal (Saelens, X., *et al*, 2004; Elmore, S., 2007).

Estos componentes liberados (Citocromo c, Smac/Diablo, Serín-proteasa HtrA2/Omi) impulsan la cascada apoptótica vía activación de caspasas. Se ha descubierto que la liberación de citocromo c activa la proteína Apaf-1 (Factor de la activación de apoptosis) y procaspasa-9, además de ATP, estableciendo un complejo proteico denominado apoptosoma, el cual activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis (Hill, M. *et al*, 2004; Huerta, S. *et al*, 2007), mientras que las proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Om promueven apoptosis por inhibición de IAP (inhibidores de proteínas apoptóticas) como cIAP1, cIAP2 y XIAP (Elmore, S., 2007; Huerta, S. *et al*, 2007). Los factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD) se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN (Elmore, S., 2007). La importancia de la degradación de ADN por endonucleasas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺ radica en que generan fragmentos de 180 a 200 pares de bases siendo altamente específicos, ya que diferencia este tipo de muerte celular programada con la necrosis, la cual no presenta patrón de degradación ni especificidad en los tamaños de los fragmentos.

Actualmente se conoce que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser apoptótica o anti-

apoptótica, quienes a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Elmore (2007) reporta que las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas pueden eventualmente ser detectadas como un referente de gran confianza de activación del proceso apoptótico.

Una de las características distintivas del proceso apoptótico, como se observó en las vías de señalización, es la activación de enzimas proteolíticas caspasas; éstas han sido clasificadas en: iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10); efectoras (caspasa-3, -6 y -7), las cuales degradan varios sustratos como citoqueratinas, Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), proteínas de citoesqueleto, membrana plasmática y caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4 y -5) (Cohen, G. M., 1997; Elmore, S., 2007).

4.9.4 Activación celular

Las respuestas de células T se inician cuando una célula T CD4 o CD8 indiferenciada madura encuentra a las células presentadoras de antígeno adecuadamente activadas que exponen el ligando péptido: MHC apropiado. Se describió el tráfico de células T indiferenciadas y células dendríticas hacia zonas especializadas de los órganos linfáticos periféricos donde es posible que se encuentren unas a otras en las zonas de células T. A continuación, se describe la generación de células T efectoras a partir de las T indiferenciadas. La activación y diferenciación de linfocitos T indiferenciados, a menudo llamada iniciación o cebamiento, es distinta de las últimas respuestas de las células T efectoras a antígeno en sus células efectoras y de las respuestas de células T de memoria iniciada en encuentros ulteriores con el mismo antígeno. Durante la activación de las células T CD4 los linfocitos T vírgenes migran desde la sangre hasta que entran en contacto con el antígeno para el cual expresan receptores específicos. Las células dendríticas tienen una función importante en la captación de los antígenos en focos infecciosos. Durante su migración hasta los ganglios linfáticos, maduran y se convierten en Células Presentadoras de Antígeno (CPA) eficientes. Una vez en el ganglio linfático, presentan a los linfocitos T CD4+ vírgenes, péptidos derivados de los antígenos de la proteína endocitada asociados a moléculas del CMH de clase II. Las reacciones inmunitarias mediadas por los linfocitos T CD4+ son desencadenadas por los antígenos proteínicos de microorganismos extracelulares que son ingeridos por células dendríticas.

Las células dendríticas responden a las estructuras microbianas expresando concentraciones elevadas de coestimuladores como las proteínas B7-1 y B7-2 y mediante la secreción de citocinas como la IL-2. La proliferación de los linfocitos T está mediada principalmente por una vía de crecimiento autocrina, en la que el linfocito T que responde secreta citocinas promotoras de su propio crecimiento y también expresa receptores para estas citocinas en la superficie celular. El

principal es la IL-2. La consecuencia de la proliferación de los linfocitos T vírgenes es la expansión clonal. Después de la exposición al antígeno, el número de LT CD4+ específicos, puede aumentar hasta aproximadamente 1 de cada 100 a 1000 linfocitos. Estos números disminuyen rápidamente cuando se elimina el antígeno y los linfocitos de memoria supervivientes para el antígeno alcanzan números del orden de 1 de cada 10⁴. Los LT activados mueren mediante apoptosis, lo que constituye un mecanismo homeostático que devuelve el sistema inmunitario a su estado basal de reposo después de haber eliminado la infección. Mientras que los LT CD4+ vírgenes producen principalmente IL-2 tras su activación, los LT CD4+ efectoros son capaces de producir un gran número y variedad de citocinas que tienen diversas actividades biológicas.

Los linfocitos T CD8+ vírgenes deben reconocer los antígenos peptídicos asociados a CMH clase I y también establecer contacto sobre las CPA o señales proporcionadas por los linfocitos T cooperadores. Las respuestas de los linfocitos CD8+ son activadas por péptidos microbianos presentes en el citosol de las células infectadas. Los linfocitos CD8+ pueden responder a algunas bacterias y virus fagocitados si estos o sus antígenos proteínicos son transportados fuera de los fagosomas hasta el citosol.

El antígeno que reconoce estos linfocitos puede ser producido en un tipo celular, como una célula tisular que es infectada por un virus o transformada, que no es una CPA profesional y no puede activar a los linfocitos T vírgenes. El antígeno tiene que acceder a la vía del CMH del tipo I de las células dendríticas.

Esta permisividad para el tráfico de proteínas desde las vesículas endosómicas hasta el citosol es exclusiva de las células dendríticas. Este proceso se denomina presentación cruzada o cebado cruzado, para indicar que un tipo celular puede presentar antígenos de otra célula y cebar, o activar, a los linfocitos T específicos de estos antígenos.

Los linfocitos T cooperadores pueden proporcionar segundas señales para los linfocitos T CD8+. La necesidad de los linfocitos cooperadores puede variar según el tipo de exposición antigénica. Los linfocitos T cooperadores pueden secretar citocinas que estimulan la diferenciación de los linfocitos T CD8+. Los linfocitos T cooperadores estimulados por el antígeno expresan el miembro trimérico de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) denominado ligando de CD40 (CD40L), que se une al CD40 de las CPA y activa a estas la célula presentadoras para hacer que sean más eficientes en la estimulación de la diferenciación de los linfocitos T CD8+. Los efectos de los linfocitos T cooperadores parecen producirse sobre todo en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ en linfocitos de memoria completamente funcionales y menos sobre la expansión clonal inicial y el desarrollo temprano de los LTC.

Después de la exposición al antígeno, el número de linfocitos T CD8+ específicos para ese antígeno puede aumentar hasta llegar a ser 1 de cada 10. Varias citocinas pueden actuar como factores de

crecimiento para dirigir la expansión clonal de los LT CD8+; entre ellas están IL-12, IL-15 e IL-7-. No está totalmente clara la función de IL-2, el primer factor de crecimiento de los linfocitos T identificado.

La característica más específica de la diferenciación de los linfocitos T CD8 es la aparición de orgánulos citoplasmáticos unidos a la membrana que contienen proteínas como perforina y granzimas. Los linfocitos T CD8 diferenciados pueden secretar citocinas, principalmente IFN- γ , linfotoxina y TNF, que actúan activando los fagocitos e induciendo la inflamación. Los fenómenos moleculares de la diferenciación de los linfocitos T CD8 suponen la transcripción de genes que codifican estas moléculas efectoras.

4.9.5 Actividad efectora

El principal mecanismo de acción de las células T citotóxicas es la liberación dependiente de calcio de gránulos citotóxicos especializados durante el reconocimiento de antígeno en la superficie de una célula blanco. Los gránulos citotóxicos son lisosomas modificados que contienen cuando menos tres clases distintas de proteínas efectoras citotóxicas que se expresan de manera específica en células T citotóxicas, tales proteínas se almacenan en los gránulos citotóxicos en forma activa, pero las condiciones en el interior de los gránulos impiden que intervengan antes de su liberación. Una de estas proteínas citotóxicas, la perforina, actúa en la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos en las membranas celulares blanco. La importancia de la perforina en la citotoxicidad está demostrada en ratones a los que se desactivo el gen para la perforina presentando una grave deficiencia de su capacidad al montar una respuesta de células T citotóxicas a muchos virus. Otra clase de proteínas citotóxicas comprende una familia de serinproteasas, llamadas Granzimas, de las cuales existen 5 en el ser humano y 10 en el ratón. Para una destrucción celular eficaz son necesarias perforina y granzima. Sus funciones se han investigado por separado en experimentos basados en semejanzas entre los gránulos citotóxicos de las células T CD8 y los gránulos de células cebadas (mastocitos), más fáciles de estudiar. La liberación de los gránulos citotóxicos de las células T ocurre después de la agregación de receptores de las células T en la sinapsis inmunitaria. La perforina actúa causando la formación de un poro en la membrana de la célula blanco por el cual pueden ingresar las granzimas, sin embargo, parece ser que la perforina y la granzima forman complejos multiméricos con el proteoglicano serglycina, que es el principal proteoglicano de los gránulos citotóxicos y actúa como un andamio. La granzima B no se difunde simplemente del espacio extracelular a través de un poro de perforina, como alguna vez se pensó; más bien, se suministra en la forma de complejos multiméricos al citosol sin la formación evidente de un poro en la membrana plasmática, un mecanismo más parecido al ingreso de un virus. Si bien aún no se define el mecanismo exacto al parecer la perforina actúa como un transponedor de estos complejos y media la liberación en el

citosol de la granzima unida. Las granzimas inducen la apoptosis en la célula blanco activando Caspasas. La granzima B escinde y activa caspasa 3 activando vías de muerte celular.

4.9.6 Receptores y ligandos de quimiocinas

Entre las citocinas liberadas por tejidos durante las fases más tempranas de infección se encuentran miembros de una familia de citocinas quimioatrayentes conocidas como quimiocinas. Tales proteínas pequeñas inducen quimiotaxis dirigida en células con capacidad de respuesta cercana. Dado que se detectaron por primera vez en valoraciones de citocinas, inicialmente se denominaron interleucinas: la Interleucina 8 (ahora conocida como CXCL-8) fue la primera quimiocina que se clonó y caracterizó. Todas las quimiocinas se relacionan en la secuencia de aminoácidos, y sus receptores son proteínas con 7 dominios transmembrana que emiten señales por medio de proteínas G acopladas. Todavía no se ha determinado la estructura atómica de un receptor de quimiocina, pero es similar a otros receptores acoplados.

Las quimiocinas funcionan principalmente como atrayentes de leucocitos; reclutan monocitos, neutrófilos y otras células efectoras a partir de la sangre hacia sitios de infección. También guían a los linfocitos en la inmunidad adaptativa. Algunas quimiocinas también funcionan en el desarrollo, la migración de linfocitos y en la angiogénesis.

Los miembros de la familia de las quimiocinas caen en su mayor parte en dos grupos amplios: quimiocinas CC con dos cisteínas adyacentes cerca del amino terminal, y quimiocinas CXC, en las cuales los dos residuos de cisteína están separados por un aminoácido. Los dos grupos de quimiocinas actúan sobre grupos diferentes de receptores. Las quimiocinas CC se unen a receptores de quimiocinas CC, de los cuales hay nueve CCR, CCR1-9. Las quimiocinas CXC se unen a receptores de CXC; hay seis de estos, CXR1-6. Tales receptores se expresan sobre diferentes tipos de célula, que en consecuencia son atraídas por diferentes quimiocinas. Las quimiocinas pueden producirse mediante una gran variedad de tipos celulares en respuesta a productos bacterianos, virus y agentes que causan daño físico. De esta manera, la infección o el daño físico de tejidos pone en marcha la producción de gradientes de quimiocina que pueden dirigir a los fagocitos a lugares donde se necesitan.

4.9.7 Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas liberadas por diversas células en el cuerpo, por lo general en respuesta a un estímulo activador, inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos. Pueden actuar de manera autócrina, parácrina y endocrina. Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a patógenos son un grupo diverso de moléculas que incluye interleucina 1- β , IL-6, IL-12, TNF- α y CXCL-8.

El nombre interleucina (IL) seguido por un numero se estableció para crear una nomenclatura estandarizada para moléculas secretadas por leucocitos y que actúan sobre los mismos.

5. JUSTIFICACIÓN

El alcoholismo y sus efectos son un problema mundial de salud pública y condiciona un elevado gasto tanto en el ámbito social como en el sanitario. En México la enfermedad hepática por alcohol ocupa la 4ª causa de muerte. Uno de los problemas relacionados con mayor frecuencia al consumo crónico de alcohol, es la enfermedad hepática, la cual se ha asociado con alteraciones en el sistema inmune en donde se encuentra incrementado el componente pro-inflamatorio y disminuido el anti-inflamatorio.

Sin embargo, se desconoce si en los linfocitos de sangre periférica se presentan procesos relacionados con activación celular, modificaciones en la actividad efectora, muerte, así como en el tráfico linfocitario y si estas alteraciones pueden influenciar el desarrollo o perpetuar el daño en cirrosis hepática por alcohol. Este trabajo propone conocer la modificación de estos procesos de manera conjunta por el consumo crónico de alcohol y/o la cirrosis hepática, lo cual puede contribuir a la búsqueda de nuevas y adecuadas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El consumo crónico de alcohol y/o la presencia de cirrosis hepática por alcohol modifican la activación celular, capacidad efectora, muerte celular y el tráfico de las células T-CD4, T-CD8, y NK así como las concentraciones de citocinas en sangre periférica?

7. HIPÓTESIS

Si el consumo crónico de alcohol está relacionado con cambios en el sistema inmunológico, entonces se encontrarán alteraciones en activación, capacidad efectora, muerte y tráfico de linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK así como la secreción de mediadores celulares en sujetos con alcoholismo y será mayor en pacientes con cirrosis hepática por alcohol.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Caracterizar la activación celular, la capacidad efectora, muerte extracelular y tráfico celular de los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK así como determinar las concentraciones de citocinas en sangre periférica de pacientes con alcoholismo y/o cirrosis hepática por alcohol y sujetos sin la enfermedad.

8.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la activación, la capacidad efectora, muerte extracelular y el tráfico de linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK de pacientes con alcoholismo, cirrosis hepática por alcohol y en sujetos sanos.
2. Determinar las concentraciones del Factor estimulante de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), de Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-8/CXCL-8, IL-10, Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e Interferón gama (IFN- γ) en pacientes con alcoholismo, cirrosis hepática por alcohol y sujetos sanos.
3. Evaluar la asociación de los parámetros clínicos con las poblaciones linfocitarias y mediadores celulares en cada grupo de sujetos.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Diseño del estudio

Finalidad: Descriptivo

Secuencia temporal: Transversal

Asignación de los factores de estudio: Observacional

9.2 Población de estudio

Se incluyeron pacientes con Enfermedad Hepática por Alcohol, que asistieron por primera vez a la consulta en la Clínica de Hígado, Departamento de Gastroenterología y donadores del Banco de Sangre del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" que conformaron el grupo control. Los participantes cumplieron con criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio (Anexo 1). A cada uno se le realizó somatometría, en donde se tomó el peso y talla para calcular el índice de masa corporal (IMC). Se evaluó el consumo de alcohol mediante el cuestionario AUDIT (Anexo 2), además se les realizó una encuesta personalizada a cerca de su

consumo de alcohol que incluye cantidad y frecuencia (Anexo 3). Este proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina, UNAM con registro FM/DI/135/2017 así como del hospital con registro DI/16/107/03/031 (Anexo 4).

9.3 Criterios de selección de la muestra

9.3.1 Criterios de inclusión

9.3.1.1 Pacientes

1. Asistir a la 1ª consulta de la Clínica de Hígado y contar con expediente del Hospital General de México.
2. Aceptar participar en el estudio (Consentimiento firmado por escrito).
3. Cumplir con criterios de alcoholismo por la OMS (>70g/día en hombres, >50g/día en mujeres durante los últimos 5 años).
4. Dependencia alcohólica positiva según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Cuarta edición (DSM-IV) (Anexo 5).
5. Establecer ausencia o presencia de cirrosis hepática por pruebas de laboratorio y gabinete para clasificar en los grupos correspondientes.
6. Panel viral negativo.
7. No haber consumido alcohol 24 horas previas a la toma de muestra.

9.3.1.2 Controles

1. Sin criterios de alcoholismo (OMS).
2. Sin antecedentes de problemas relacionados con el alcoholismo.
3. Aceptar participar en el estudio (Consentimiento firmado por escrito).
4. Consumo no riesgoso de alcohol (<10 g/día en hombres y mujeres).
5. Puntuación AUDIT <8.
6. Panel viral negativo.
7. No haber consumido alcohol 24 horas previas a la toma de la muestra.

9.3.2 Criterios de exclusión

9.3.2.1 Para Pacientes y Controles

1. No aceptar participar en el estudio.
2. No poder obtener la muestra de sangre.
3. Presencia de alteraciones neurológicas, psiquiátricas, antecedentes de traumatismos craneoencefálicos con pérdida del estado de alerta.

4. Hepatopatopatía o nefropatía de cualquier origen, excepto el grupo de casos con daño hepático.
5. Enfermedades que puedan alterar el sistema inmune como: Diabetes Mellitus, desnutrición de cualquier grado.
6. Enfermedades de tipo autoinmune.
7. Tuberculosis antecedentes de haberla padecido.
8. Neoplasias de cualquier origen.
9. Uso de fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores o esteroides por cualquier causa.
10. Sujetos menores de edad.
11. Mujeres embarazadas o lactando.

9.3.3 Criterios de Eliminación

9.3.3.1 Para Pacientes y Controles

1. Inicio de tratamientos inmunomoduladores o hepatotóxicos una vez incluidos en el estudio.
2. Positividad a algún antígeno viral.
3. Imposibilidad de realizar las determinaciones en las muestras de sangre periférica.
4. Que ya no desee participar en el estudio.

9.4 Cálculo del tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizaron los datos obtenidos previamente (estudio piloto) por este grupo de investigación, en el cual se determinó el perfil linfocitario de pacientes con alcoholismo que fueron comparando contra un grupo control, se tomó el valor de la desviación estándar de las células NK que fue de 9, se determinó la varianza igual a 81 y se sustituyeron los valores en la fórmula.

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2 (2)}{d^2}$$

En donde,

$Z\alpha$: error alfa (error tipo I) = 1.96

$Z\beta$: error beta (error tipo II) = 0.84

S: varianza de la medición de NK en linfocitos de sangre periférica= 9

d: valor mínimo de la diferencia que se desea detectar= 7

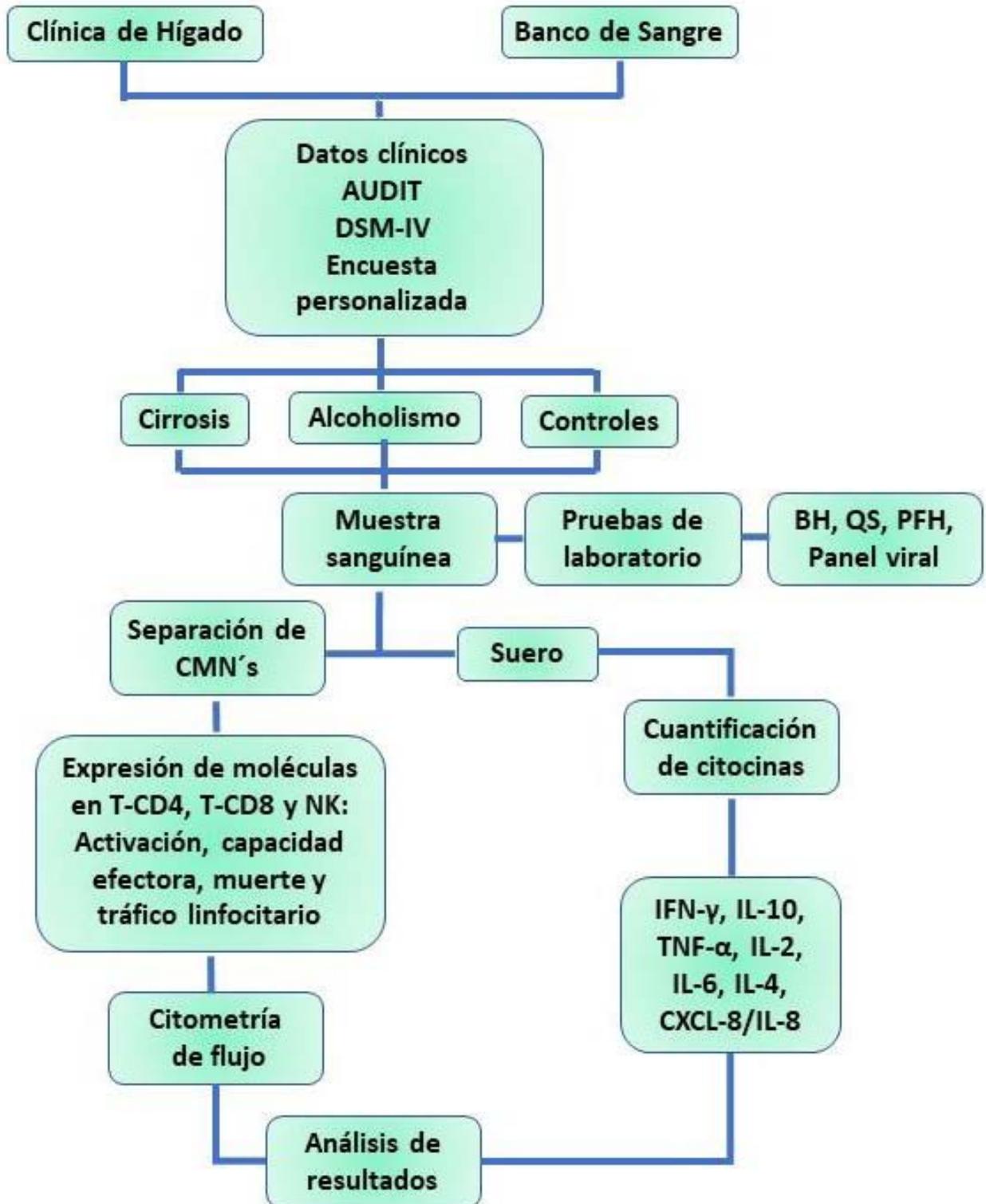
Por lo tanto:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 9^2 (2)}{7^2}$$

$$n = \frac{(7.84) (81) (2)}{49}$$

n= 25 sujetos por grupo

9.5 Diagrama de flujo



9.6 Obtención de muestras

De cada participante, se tomaron 20 ml de sangre periférica para realizar biometría hemática completa (BHC), química sanguínea (QS), así como pruebas de funcionamiento hepático (PFH), panel viral para hepatitis B, C y VIH.

Los 15 ml restantes se transportaron al Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) ubicado dentro del Hospital General de México en la Unidad de Medicina Experimental para realizar la separación de células mononucleares, inmunofenotipo y la determinación de mediadores celulares.

9.7 Separación de Células Mononucleares (CMN)

Para la separación se utilizó sangre total, la cual se diluyó 1:2 con PBS 1X. Para la formación del gradiente se colocaron 3.5 ml de Ficoll-Histopaque y se adicionó la sangre diluida para formar el gradiente. Posteriormente el gradiente fue centrifugado 20 min a 2000 rpm y se recuperó el halo de células mononucleares (anillo blanco). Una vez obtenidas las células, se lavaron con PBS 1X y finalmente se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía 5 % de Suero Bovino Fetal (SBF) y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se realizó el conteo celular y determinó la viabilidad de las células mediante el método de exclusión por azul tripano.

9.8 Marcadores inmunológicos

9.8.1 Inmunofenotipo

Una vez obtenidas las células, se diseñó un panel de análisis multiparamétrico de las diferentes moléculas (Tabla 1) para determinar muerte celular, viabilidad, activación, capacidad efectora y tráfico linfocitario de las células T-CD4, T-CD8 y NK.

Tabla 1. Diseño de paneles para determinar características de los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK.

PANEL	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
MUERTE	Caspasa 3	CD178L	CD95	CD56	CD8	CD3
VIABILIDAD		Anexina V	7AAD	CD4	CD8	CD3
ACTIVACIÓN	CD56	CD3	CD16	CD69	CD8	CD25
ACTIVACIÓN/MUERTE	NKG2D	TRAIL	CD16	CD56	CD16	CD3
CAPACIDAD EFECTORA	Perforina	Granzima B	CD16	CD56	CD8	CD3
TRÁFICO CELULAR	CD56	CXCR4	CXCR3	CD4	CD8	CD3

El estudio del inmunofenotipo se realizó por un método de inmunofluorescencia directa con un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) que detectan antígenos sobre las células en las diferentes subpoblaciones. Para la determinación de moléculas extracelulares, se agregó 5 μ L de anticuerpo de acuerdo al panel, el cual, fue incubado durante 15 min a 4°C en oscuridad, posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X y homogenizadas con 300 μ L de PBS 1X para su lectura en el citómetro de flujo. En el marcaje de moléculas intracelulares, primero las células fueron fijadas y permeabilizadas (citofix/citoperm), posteriormente se agregó el anticuerpo asignado que fue incubado durante 1 hora a 4 °C y en oscuridad, las células fueron lavadas y homogenizadas con perm wash 1X, para su lectura en el citómetro.

9.8.2 Análisis por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo modelo FACS Canto II (Becton-Dickinson), calibrado con perlas para el análisis de las muestras. La adquisición de datos se realizó empleando el software FACS DIVA, se adquirieron 20,000 eventos con un mínimo de 1,000 linfocitos dentro de la región de análisis. Se realizó el análisis de la dispersión frontal de luz (FSC) y de la dispersión lateral (SSC); al mismo tiempo por medio de la fluorescencia de cada anticuerpo se seleccionaron las subpoblaciones. Los resultados fueron analizados en graficas de contornos y son presentados en porcentaje de células positivas para cada caso.

9.8.3 Determinación de citocinas

Se utilizó la tecnología por arreglo en suspensión múltiple Luminex, mediante un kit (The Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-Plex) en donde se determinaron los siguientes analitos: GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8/CXCL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ . El ensayo permite la detección de hasta 100 analitos diferentes en una sola muestra ya que utiliza microesferas, cada una con un código de color diferente (espectro) que permite la discriminación de lecturas individuales, cada microesfera está acoplada a un anticuerpo contra un objetivo diferente. Se agregaron 50 μ L de suero a cada pozo que contenía las microesferas acopladas, fue incubado durante 30 min consiguiendo el reconocimiento y la unión específica proteína-anticuerpo, posteriormente se colocaron los anticuerpos de detección marcados con biotina, se utilizó estreptavidina conjugado con ficoeritrina que se une a los anticuerpos de detección marcados con biotina. Finalmente, las muestras fueron determinadas en el equipo, el cual utiliza dos láseres, uno rojo que identifica y excita la microesfera y un verde que da la señal del reportero asociado, siendo directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra (Figura 4).

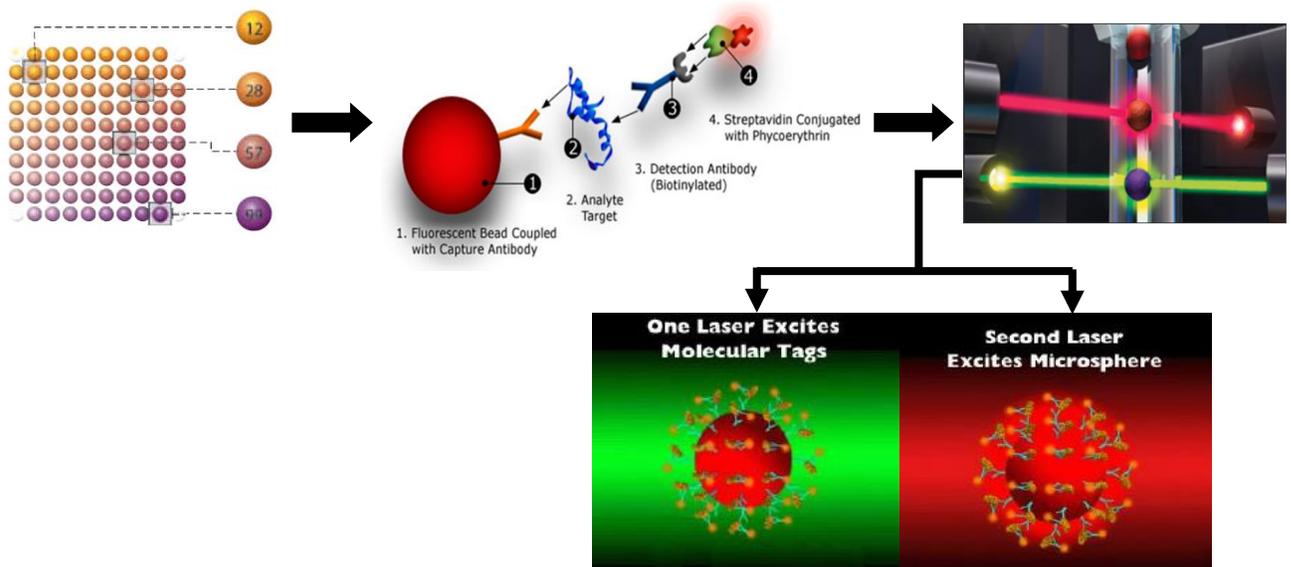


Figura 4. Complejo formado para la detección de los diferentes analitos en suero.

9.9 Análisis estadístico

Se evaluó la distribución de los datos utilizando la prueba Kolmogorov-Smirnov para conocer que variables presentaban distribución normal o no. Se utilizó Chi-cuadrada (X^2) para las variables categóricas. ANOVA más análisis ortogonales para variables con distribución normal y U de Mann Whitney para las variables con distribución no normal para conocer si existen diferencias en la expresión de marcadores entre los grupos de estudio. En las correlaciones se utilizó la prueba de Rho de Spearman para establecer si existen relaciones entre los diferentes parámetros determinados empleando el programa estadístico “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) versión 21.0 para Windows. Los datos se expresan en frecuencias, media \pm desviación estándar y mediana con Rango Intercuartil (RIQ). Se tomó como significativa una $p < 0.05$.

10. RESULTADOS

10.1 Parámetros demográficos y de consumo de alcohol

A continuación, se muestran los datos demográficos de los Pacientes (Px), el grupo con Alcoholismo (A), Cirrosis hepática (CH) y los sujetos Control (CT):

Se incluyeron en total 55 participantes, 30 fueron pacientes con consumo crónico de alcohol que presentaban o no daño, la frecuencia en mujeres fue del 20 % y 80 % hombres ($p < 0.01$); en el grupo de pacientes 15 sujetos presentaron alcoholismo y 15 cirrosis, el grupo control estuvo formado por 25 sujetos donde el 60 % fueron mujeres y 40 % hombres.

La media de edad entre Px y CT fue diferente ($p < 0.001$), el grupo con CH fue mayor al grupo CT y al grupo con A, respectivamente ($p < 0.001$). Los valores en la puntuación de AUDIT fueron altos en los pacientes, así como en el grupo con A y CH comparado con los CT ($p < 0.001$).

De acuerdo a los resultados de consumo de alcohol por día, éste fue mayor en Px comparado con CT ($p < 0.001$); sin embargo, se observó que en los pacientes con CH el consumo crónico de alcohol fue más alto comparado vs CT ($p < 0.001$); en los años de consumo de alcohol, el promedio del grupo con CH fue más alto que el grupo con A ($p < 0.01$). No hubo diferencias significativas en IMC y edad de inicio del consumo crónico de alcohol entre los grupos. (Tabla 2)

Tabla 2. Datos demográficos y de consumo crónico de alcohol en la población de estudio.

	Controles	Pacientes	Alcoholismo	Cirrosis	
Género n%	Mujeres	15 (60)	6 (20) ^a	3 (20)	3 (20)
	Hombres	10 (40)	24 (80)	12 (80)	12 (80)
Edad (Años)	29±11	42±14 ^a	34±11	51±11 ^{c,d}	
IMC (Kg/m²)	25.3±5	26±4	26.5±3.3	26±4	
AUDIT	3.2±1.6	21±8 ^a	20±7 ^b	17±11 ^c	
Consumo por día (g)	2.9±3.3	173±220 ^a	179±104	318±166.5 ^c	
Años de consumo	NA	23±14	17±13	28.5±13 ^d	
Edad de inicio	NA	16±4	16±3	14±6	

Datos expresados en media ± desviación estándar. "a" Diferencia entre pacientes y controles; "b" Diferencia entre alcoholismo y controles; "c" Diferencia entre cirrosis y controles; "d" Diferencia entre alcoholismo y cirrosis. NA: No Aplica; %: Porcentaje; g: gramos.

10.2 Parámetros bioquímicos

El promedio en la concentración de hemoglobina, porcentaje y número de linfocitos y plaquetas, disminuyó en los Px comparados con el grupo CT ($p < 0.02$); sin embargo, el porcentaje de neutrófilos y monocitos aumentó en los Px comparados contra el grupo CT ($p < 0.01$).

Como se puede observar en sujetos con A se incrementó el porcentaje de neutrófilos y disminuyó el porcentaje de linfocitos ($p < 0.001$), la concentración de hemoglobina, el porcentaje y número de linfocitos y plaquetas disminuyeron en CH comparado contra CT ($p < 0.01$) y A ($p < 0.03$); el porcentaje de neutrófilos y monocitos aumentó en CH vs CT ($p < 0.001$) y A ($p < 0.03$).

La media en VCM fue más alta en el grupo CH vs el grupo CT ($p < 0.05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de leucocitos circulantes (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros celulares en los diferentes grupos.

	Controles	Pacientes	Alcoholismo	Cirrosis
Hb (g/dl)	16±1.2	14±3 ^a	16±1.2	13±3 ^{c,d}
VCM (fl)	89±4.4	93±9	89±4	96±10 ^c
Leucocitos (miles/μL)	5.3±2	6.6±4	6.4±1.5	6.8±5.5
Neutrófilos (%)	30±12	59±16 ^a	49±18 ^b	66±12 ^{c,d}
Monocitos (%)	6±5	10±3 ^a	8±2	10.5±3.3 ^{c,d}
Linfocitos (%)	58±17	28±15 ^a	39±17 ^b	22±9 ^{c,d}
Linfocitos (miles/μL)	2.2±0.7	1.4±0.6 ^a	1.8±0.6	1.2±0.6 ^c
Plaquetas (miles/μL)	269±67	179±95 ^a	239±49	128±96 ^{c,d}

Datos expresados en media ± desviación estándar. "a" Diferencia entre pacientes y controles; "b" Diferencia entre alcoholismo y controles; "c" Diferencia entre cirrosis y controles; "d" Diferencia entre alcoholismo y cirrosis. Hb: Hemoglobina; VCM: Volumen Corpuscular Medio; %: porcentaje; μm^3 : micrómetros cúbicos; μL : microlitros.

En las pruebas de función hepática se observó un aumento en las concentraciones de AST, ALT y GGT, así como una disminución en la albúmina ($p < 0.01$) entre Px y CT. El promedio en la concentración de ALT es alto en A y CH comparado contra los CT ($p < 0.01$), mientras que AST y GGT aumentan en el grupo con CH comparado contra A y CT ($p < 0.05$), las concentraciones de albúmina disminuyeron en CH y CH vs A ($p < 0.001$) (Tabla 4).

Tabla 4. Enzimas hepáticas en los diferentes grupos.

	Controles	Pacientes	Alcoholismo	Cirrosis
AST (U/L)	23±7	45±25 ^a	28±10	60±24 ^{c,d}
ALT (U/L)	20±12	36±22 ^a	32.5±24 ^b	38±20 ^c
GGT (U/L)	21±12	105±145 ^a	40±29	160±179 ^{c,d}
Albúmina (g/dl)	4.4±0.2	3.6±1 ^a	4.4±0.3	3±1 ^{c,d}

Datos expresados en media ± desviación estándar. "a" Diferencia entre pacientes y controles; "b" Diferencia entre alcoholismo y controles; "c" Diferencia entre cirrosis y controles; "d" Diferencia entre alcoholismo y cirrosis. Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; VCM: Volumen Corpuscular Medio; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanino aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; g/dl: Gramos por decilitro; U/L: Unidades por litro; mg/dl: miligramos por decilitro.

10.3 Parámetros Inmunológicos

Las subpoblaciones de linfocitos se muestran en número de células ($1000/\text{mm}^3$) así como en frecuencia para cada una; la expresión de las diferentes moléculas en frecuencia donde se evaluó activación celular, capacidad efectora, muerte y tráfico celular de acuerdo a los diferentes grupos de estudio: sujetos control, pacientes (con y sin daño), pacientes con alcoholismo y cirrosis hepática.

10.3.1 Determinación de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+)

El número promedio de linfocitos T-cooperadores en los Px fue 0.5 ± 0.2 , en el grupo con A fue 0.56 ± 0.20 , en CH 0.38 ± 0.23 y en CT 0.79 ± 0.15 ; observando un menor número de células T-CD4 en el grupo con CH comparado contra CT (Figura 5a).

La frecuencia en el porcentaje promedio en los Px fue 33.4 ± 8.7 , en el grupo con A fue 36 ± 9.7 , en CH 31 ± 7 y 38 ± 4.5 en el grupo CT; no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos (Figura 5b).

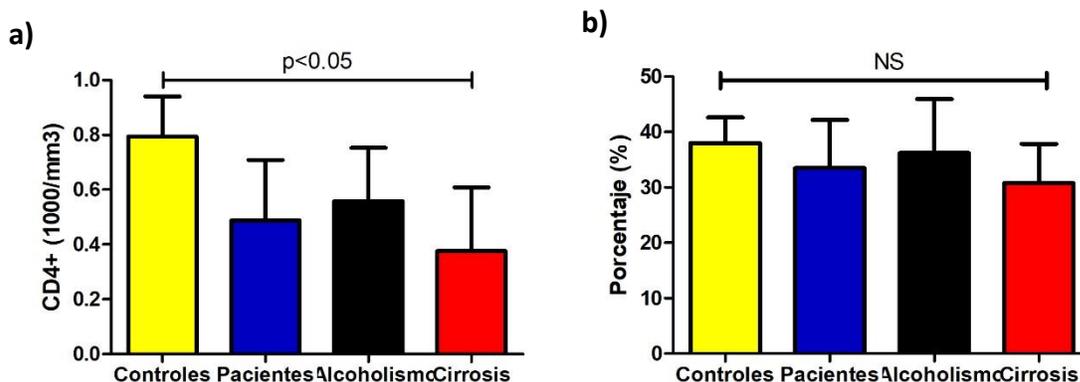


Figura 5. Linfocitos T-cooperadores, número (a) y frecuencia (b) en las poblaciones de estudio. Datos expresados en media \pm desviación estándar. NS: No significativo

10.3.1.1 Determinación de la viabilidad de linfocitos T cooperadores.

Se comparó el porcentaje promedio de viabilidad celular entre Px y CT que fue de 82.3 ± 13 y 97 ± 3 , observándose una disminución en los pacientes ($p < 0.05$).

El promedio de células viables en A fue de 99.5 ± 0.5 , mientras que para el grupo de CH fue menor 54 ± 29 ; observando una disminución en la viabilidad entre CH y CT, así como CH y A obteniendo diferencias significativas (Figura 6).

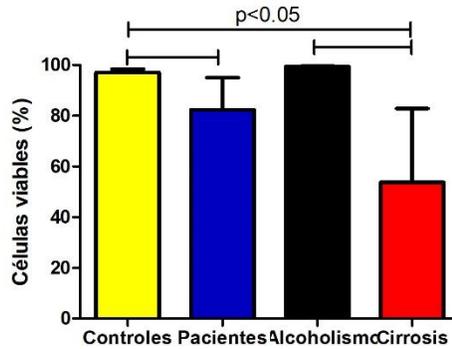


Figura 6. Frecuencia de linfocitos T cooperadores viables en los diferentes grupos obtenido por Anexina V y 7AAD. Datos expresados en media \pm desviación estándar.

10.3.1.2 Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos T cooperadores

La expresión media del receptor para IL-2 (CD25+) entre Px y CT fue de 3 ± 0.5 y 5.1 ± 0.8 , observándose una disminución en la expresión del receptor en los Px ($p < 0.05$).

La expresión media en el grupo con A fue 2.4 ± 0.4 y en CH 4 ± 1.1 ; se obtuvieron diferencias significativas entre A y CT disminuyendo la expresión del receptor; no obstante, aumenta la expresión de CD25+ cuando se compara CH vs A (Figura 7a).

El promedio de expresión para el receptor de activación temprana (CD69+) entre Px y CT fue de 1.5 ± 0.2 y 6 ± 1 , respectivamente observándose una disminución en la expresión de CD69 en los Px ($p < 0.03$).

El promedio en el grupo con A fue 1.6 ± 0.4 y 1.1 ± 0.2 en CH; mostrando una menor expresión de CD69+ en ambos grupos A y CH comparados contra el grupo CT (Figura 7b).

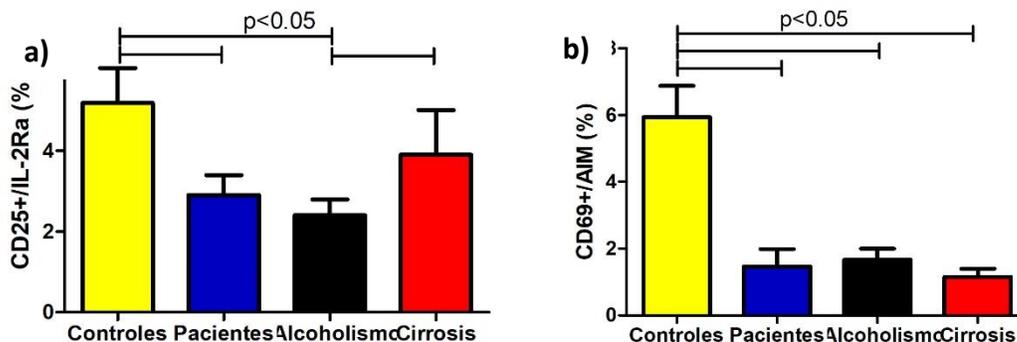


Figura 7. Expresión en de receptores de activación celular sobre linfocitos T cooperadores. a) Frecuencia de linfocitos que expresan CD25+/IL-2Ra; b) Frecuencia de linfocitos T cooperadores que expresan CD69+/AIM. Datos expresados en media \pm error estándar.

10.3.1.3 Expresión del Receptor y Ligando de FAS (CD95+ y CD178+) así como Caspasa 3 activa en linfocitos T cooperadores.

La expresión promedio del receptor de Fas (CD95+) sobre linfocitos T cooperadores en el grupo de Px fue 15.6 ± 5 , en A fue 12.1 ± 4.5 , en CH 18.5 ± 8.5 y en los sujetos CT 10.4 ± 1 ; observándose una mayor expresión en el grupo con CH, encontrando diferencias significativas contra CT (Figura 8a).

El promedio de expresión para el Ligando de Fas (CD178+) en los Px fue de 33 ± 12 y en Controles 6.7 ± 3 , observando un aumento en la expresión del ligando en Px ($p < 0.05$).

La media en el grupo con A fue 24 ± 18 y 40 ± 16.5 para CH; se observó un aumento en la expresión del ligando en CH, obteniendo diferencias significativas entre CH y CT (Figura 8b).

La expresión promedio de Caspasa 3 en su forma activa en Px y CT fue de 10 ± 8 y 0.1 ± 0.03 , observándose un aumento en su expresión en los Px ($p < 0.05$), mientras que en el grupo de A fue 22 ± 16 y en el grupo con CH fue de 0.1 ± 0.05 , respectivamente no encontrando diferencias significativas (Figura 8c).

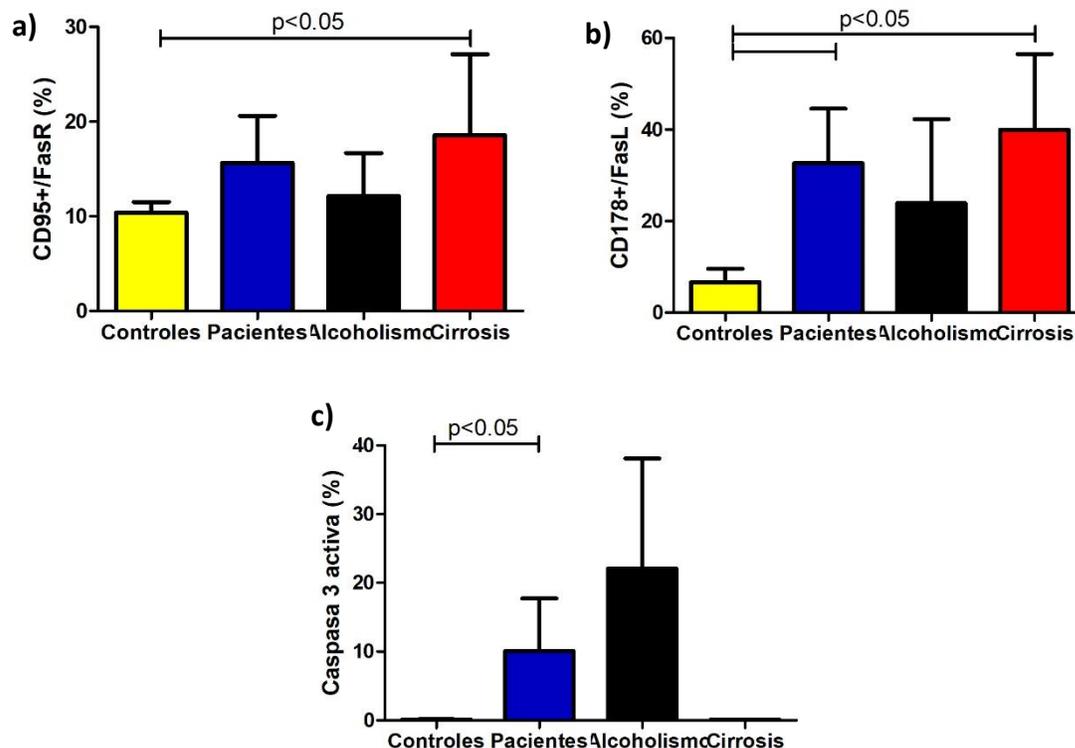


Figura 8. Expresión en linfocitos T cooperadores de moléculas que participan en los procesos de muerte celular, sujetos con consumo crónico de alcohol sin daño y sujetos con cirrosis hepática. a) Frecuencia de expresión del receptor Fas; b) Expresión del ligando de Fas; c) Expresión de caspasa 3 activa. Datos expresados en media \pm error estándar.

10.3.1.4 Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos T cooperadores

El porcentaje en la expresión del receptor de quimiocina CXCR3 (CD183+) sobre linfocitos T cooperadores fue 6.3 ± 3 en Px, 1.9 ± 0.6 en A, 15 ± 6.7 en CH y 8 ± 6.3 en CT; se observó un aumento en la expresión en el grupo con CH comparado con A (Figura 9a). Para el receptor CXCR4 (CD184+), el promedio en los Px fue de 6.5 ± 3.5 , en el grupo con A fue de 9 ± 5.2 , en CH 2 ± 0.7 y en los sujetos CT 16.3 ± 8.3 ; en los pacientes con CH disminuyó la expresión comparado contra A y CT controles, obteniendo diferencias significativas (Figura 9b).

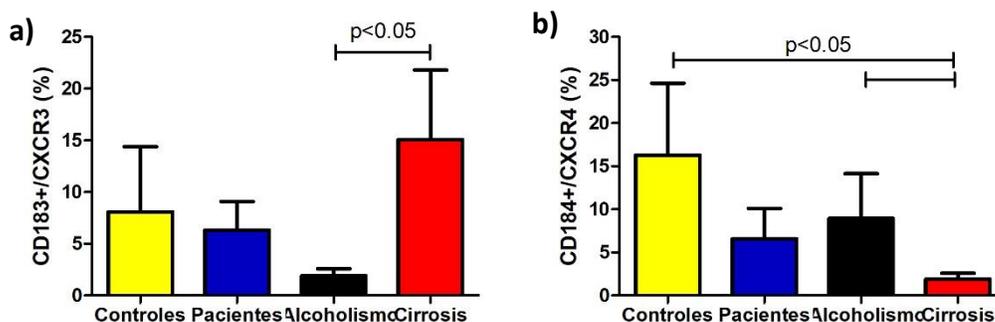


Figura 9. Expresión en linfocitos T cooperadores de moléculas que participan en el tráfico linfocitario de sujetos con consumo crónico de alcohol, cirrosis hepática y sujetos control. a) Frecuencia de linfocitos T cooperadores que expresan CD183+/CXCR3; b) Frecuencia de linfocitos T cooperadores que expresan CD184+/CXCR4. Datos expresados en media \pm EE.

10.3.2 Determinación de linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+)

El promedio en el número de linfocitos T-citotóxicos en los Px fue de 0.2 ± 0.05 , en A 0.34 ± 0.06 , 0.13 ± 0.03 en el grupo con CH y 0.44 ± 0.13 para los sujetos CT. El número de células citotóxicas fue menor en el grupo con CH comparado contra A y CT.

De acuerdo al promedio en porcentaje en los Px fue de 17.6 ± 1.6 , para el grupo con A fue 21.5 ± 2.3 , en CH 13.3 ± 1.4 y 21.6 ± 2.3 en CT, observando un porcentaje menor de células citotóxicas en el grupo con CH, se obtuvieron diferencias significativas entre CH vs A y CT (Figura 10).

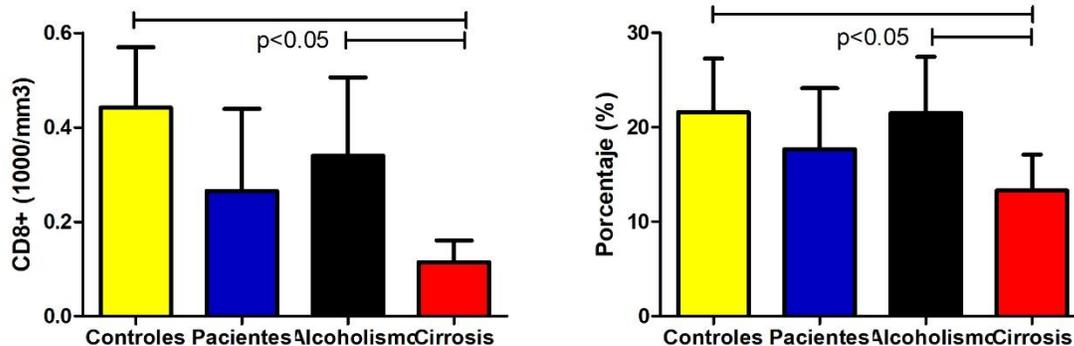


Figura 10. Número y frecuencia de linfocitos T-citotóxicos en los diferentes grupos. Datos expresados en media \pm desviación estándar.

10.3.2.1 Determinación de la viabilidad de linfocitos T citotóxicos.

El promedio de la viabilidad de linfocitos T citotóxicos en los Px fue de 82 ± 10 y en el grupo CT fue de 99 ± 0.5 , observando una disminución en la viabilidad de estas células ($p < 0.04$). La viabilidad en A fue 96 ± 2.5 y en CH 49.2 ± 28.8 , respectivamente; el grupo con una disminución en la viabilidad celular fueron los px con CH, observándose diferencias significativas entre CH vs A y CT (Figura 11).

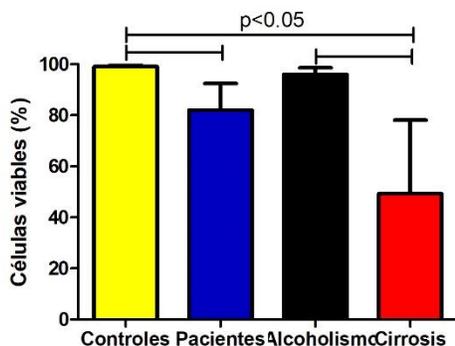


Figura 11. Frecuencia de células viables en los diferentes grupos. Datos expresados en media \pm desviación estándar.

10.3.2.2 Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos T citotóxicos.

La expresión del receptor para IL-2 (CD25+) en los Px fue de 68 ± 11.5 , en el grupo con A fue 75.4 ± 12.6 , en CH 57 ± 23.3 y en CT 51.3 ± 27.3 ; no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figura 12a). Para el receptor de activación temprana (CD69+), el promedio en el grupo de Px fue de 1.4 ± 0.6 en el grupo con A fue 1 ± 0.6 , 1.9 ± 1.3 en CH y en CT 5 ± 2.2 ; observando una disminución en la expresión en todos los Px comparados contra CT y A vs CT (Figura 12b). La

expresión de NKG2D (CD314+) en el grupo de Px fue 68 ± 40 y en CT 34 ± 1.1 , respectivamente ($p < 0.03$), se observó un aumento en la expresión de NKG2D en los Px. En los pacientes con A fue 69.2 ± 17.8 y 65.5 ± 29.3 en CH; observando un incremento en la expresión de la molécula en A y CH comparados contra CT, obteniendo diferencias significativas (Figura 12c).

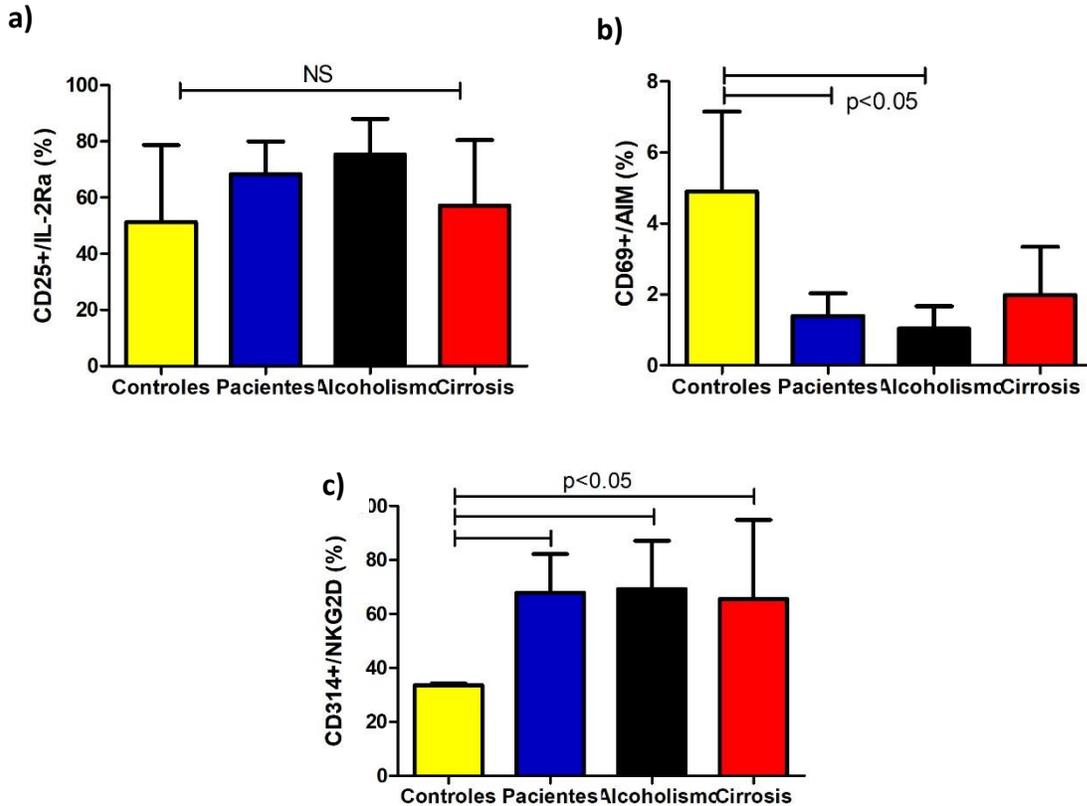


Figura 12. Expresión de receptores de activación celular. a) Frecuencia de linfocitos que expresan CD25+; b) Frecuencia de linfocitos que expresan CD69+; c) Frecuencia de células que expresan CD314+ en los diferentes grupos. Datos expresados en media \pm EE. NS: No significativo.

10.3.2.3 Capacidad efectora de los linfocitos T citotóxicos.

La expresión de granzima B en los Px fue de 33 ± 9 y en CT 18.5 ± 0.6 , se observó el aumento en la expresión de esta molécula en los Px, obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$). En los linfocitos citotóxicos la expresión de granzima B en el grupo con A fue 24.1 ± 7.6 y 46.7 ± 21.5 en CH; observando un aumento en la expresión de esta molécula en el grupo con CH. Se obtuvieron diferencias significativas entre CH contra A y CT (Figura 13a). La frecuencia promedio de perforina en los Px fue de 30.5 ± 11.3 y en el grupo CT 5.2 ± 0.5 , respectivamente ($p < 0.02$), mientras que para el grupo de A fue 31 ± 13.2 y en CH 29 ± 26.5 ; observándose un aumento en la expresión de

perforina en los Px, en el grupo con A y CH, se obtuvieron diferencias significativas entre Px vs CT, A y CH vs CT (Figura 13b).

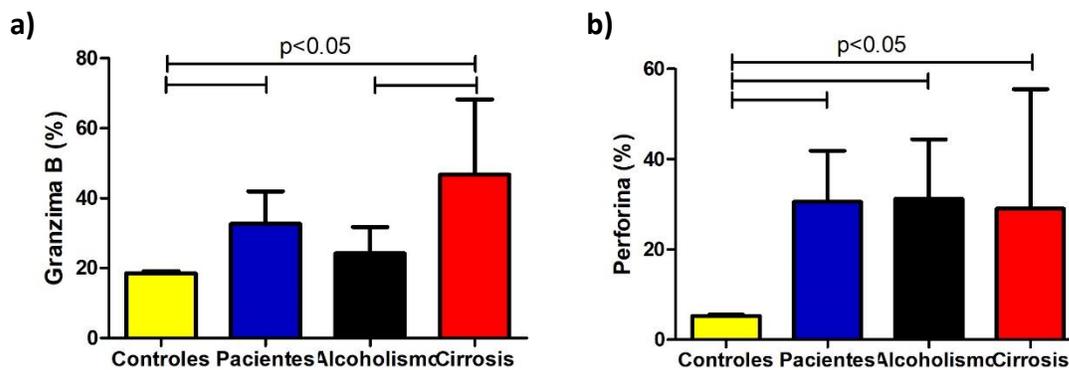


Figura 13. Expresión de moléculas efectoras sobre linfocitos T citotóxicos. a) Frecuencia de linfocitos que expresan granzima B; b) Frecuencia de linfocitos que expresan perforina en los diferentes grupos. Datos expresados en media \pm EE.

10.3.2.4 Expresión del Receptor y Ligando de FAS (CD95+ y CD178+), TRAIL (CD253+) así como Caspasa 3 activa en linfocitos T citotóxicos.

El promedio en la expresión del receptor de Fas (CD95+) sobre linfocitos T citotóxicos en Px fue de 1 ± 0.5 , en A fue 0.4 ± 0.1 , 1.7 ± 1.1 en CH y en CT 0.3 ± 0.1 ; se observó un aumento en la expresión del receptor en CH obteniendo diferencias significativas vs CT (Figura 14a). La expresión del ligando de Fas (CD178+) en los Px fue de 1 ± 0.5 y en CT 0.1 ± 0.1 , respectivamente ($p < 0.05$), observándose un aumento en la expresión del ligando de Fas en los Px. La expresión promedio en el grupo con A fue de 1.4 ± 1 y 0.3 ± 0.1 en CH; se observó un aumento en la expresión de esta molécula y diferencias significativas entre el grupo con A vs CT y CH (Figura 14b). La expresión promedio de CD253+/TRAIL en los Px fue de 0.2 ± 0.1 y en CT 1.4 ± 0.4 , respectivamente ($p < 0.02$), mientras que en el grupo con A fue 0.2 ± 0.2 y en CH 0.2 ± 0.18 ; donde disminuyó la expresión de la molécula en los Px, A y CH comparados contra el grupo CT (Figura 14c). La expresión de Caspasa 3 activa en los Px fue de 7 ± 6 y en CT fue 0.1 ± 0.0 , observando un aumento en la expresión de esta molécula en los Px con diferencias significativas ($p < 0.04$), la expresión en el grupo A obtuvo en promedio 13.2 ± 11.6 no observándose diferencias significativas (Figura 14d).

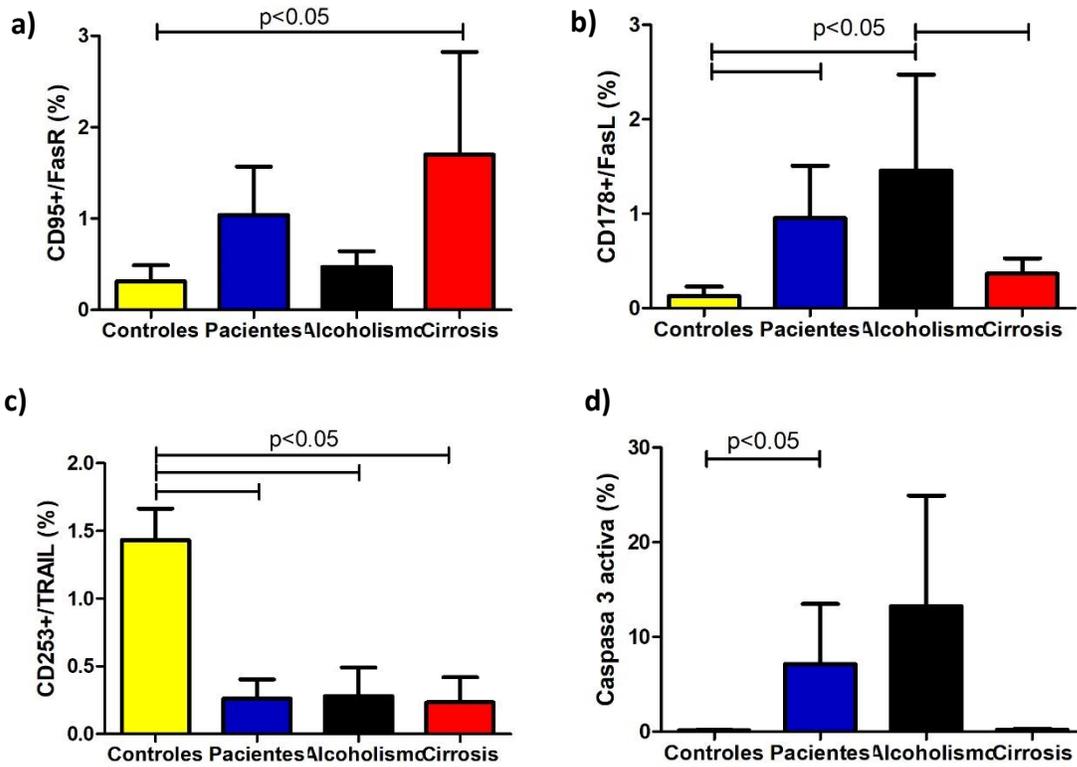


Figura 14. Expresión de moléculas de muerte celular sobre los linfocitos T citotóxicos. a,b) Frecuencia de linfocitos que expresan el receptor y ligando de Fas; c) Frecuencia de linfocitos citotóxicos que expresan TRAIL; d) Expresión de Caspasa 3 activa en linfocitos T citotóxicos. Datos expresados en media \pm EE.

10.3.2.5 Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos T citotóxicos

La frecuencia en la expresión del receptor de quimiocina CXCR3 (CD183+) fue 2 ± 1 en Px, 0.7 ± 0.2 en A, 5 ± 2.5 en CH y 12.2 ± 10 en CT; se obtuvieron diferencias significativas entre Px, A y CT, disminuyendo en ambos, así como CH y A, aumentando en CH (Figura 15a). Para el receptor CXCR4 (CD184+), el promedio en los Px fue 4 ± 2.2 , en el grupo A fue 4.3 ± 3 , en CH 3.6 ± 3 y en CT 6.8 ± 3.5 ; no observando diferencias significativas entre grupos (Figura 15b).

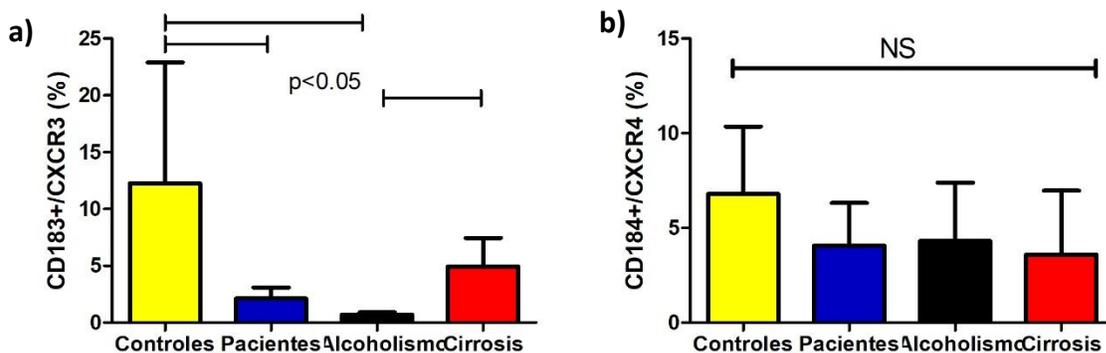


Figura 15. Expresión de receptores de quimiocinas sobre los linfocitos T citotóxicos. a -b) Frecuencia de linfocitos T citotóxicos que expresan CD183+/CXCR3 y CD184+/CXCR4. Datos expresados en media±EE.

10.3.3 Determinación de linfocitos NK (CD3-CD56+)

Se obtuvo en promedio 0.16 ± 0.03 de linfocitos NK en los Px, 0.2 ± 0.03 en el grupo con A, 0.07 ± 0.03 en CH y 0.32 ± 0.07 en CT; obteniendo diferencias significativas entre CH vs A y CT, teniendo un menor número de células NK en CH.

De acuerdo a la frecuencia promedio se obtuvo 12.6 ± 1.3 en los Px, 12.3 ± 1.2 en A, 13 ± 3 para el grupo CH y 13.6 ± 2.6 para CT. No se presentaron diferencias significativas entre grupos (Figura 16).

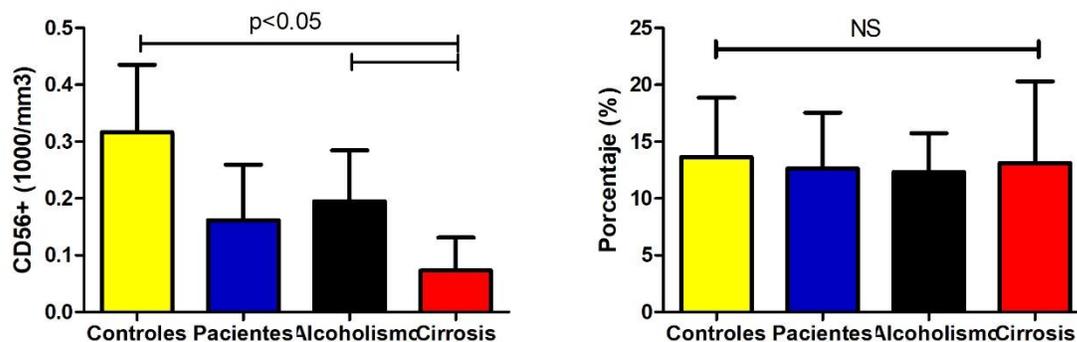


Figura 16. Número y frecuencia promedio de linfocitos NK en los diferentes grupos. Datos expresados en media ± desviación estándar. NS: No significativo

10.3.3.1 Determinación de la viabilidad de linfocitos NK.

En promedio los Px obtuvieron 85.7 ± 7.7 de células viables, en el grupo con A fue de 89.7 ± 7.2 , en CH fue 73.5 ± 26.3 y 98.9 ± 0.5 en CT; no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figura 17).

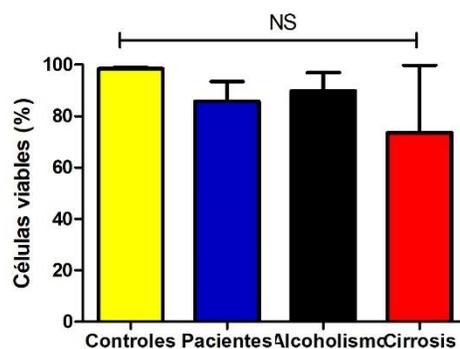


Figura 17. Frecuencia de células NK viables en los grupos. Datos expresados en media \pm desviación estándar.

10.3.3.2 Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos NK

La expresión del receptor para IL-2 (CD25+) en los Px fue 40 ± 12.5 , en el grupo A fue 31 ± 17.5 , en CH 59 ± 3.5 y 0.7 ± 0.2 en CT; se observa el aumento en la expresión de CD25+ en los pacientes Px ($p < 0.05$), se obtuvieron diferencias significativas entre pacientes y CT, así como entre CH y A (Figura 18a). Para el receptor de activación temprana (CD69+), el promedio en los Px fue 1.2 ± 0.5 y 4 ± 0.6 en los Controles obteniendo diferencias significativas ($p < 0.03$), mientras que en el grupo A fue 0.6 ± 0.5 , 2.2 ± 1 en CH y en CT 4 ± 0.6 ; mostrando diferencias significativas entre pacientes con alcoholismo y CT así como CH vs A y CH vs CT (Figura 18b), la expresión de esta molécula se encuentra disminuida en los pacientes y entre ellos la expresión aumenta en el grupo CH. La expresión para NKG2D (CD314+) en los Px fue 6.5 ± 5.6 , en A fue 10.3 ± 8.8 , 0.2 ± 0.2 en CH y 8.5 ± 0.5 para los sujetos CT; observando una disminución en el grupo CH, se encontraron diferencias significativas en CH comparado con CT y A (Figura 18c).

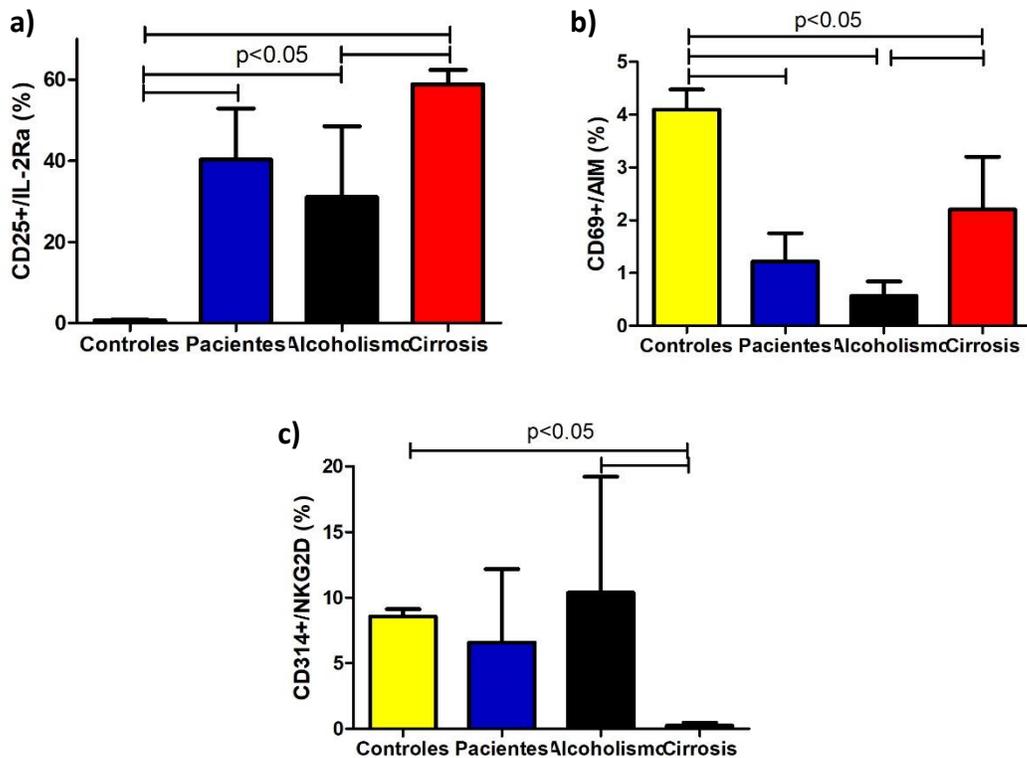


Figura 18. Expresión de receptores de activación celular sobre linfocitos NK. a) Frecuencia de células NK que expresan CD25/IL-2Ra; b) Frecuencia de linfocitos que expresan CD69+/AIM; c) Frecuencia de células que expresan CD314+/NKG2D. Datos expresados en media \pm EE.

10.3.3.3 Capacidad efectora de los linfocitos NK

La expresión de granzima B en los linfocitos en el grupo de Px fue 54.6 ± 13.2 , en A fue 43.4 ± 19.7 , 73.4 ± 7.4 en CH y 54 ± 6 en los CT; siendo el grupo con CH el que tiene mayor expresión de la molécula, se obtuvieron diferencias significativas entre CH contra CT (Figura 19a). La frecuencia promedio de perforina en los Px fue 81.4 ± 7 , en A fue 75 ± 9 , en CH 96 ± 2.2 y 82.4 ± 7.2 en CT; se observaron diferencias entre CH comparados contra A y CT teniendo mayor expresión en el grupo CH (Figura 19b).

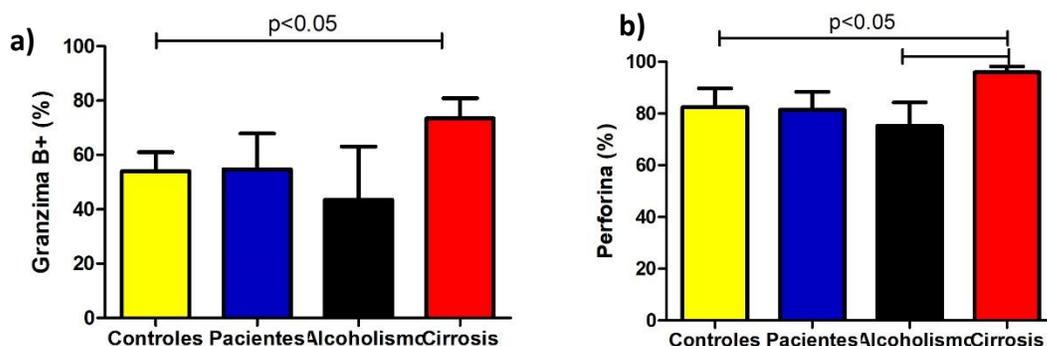


Figura 19. Expresión de moléculas efectoras sobre linfocitos NK. a) Frecuencia en la expresión de granzima B; b) Frecuencia en la expresión de perforina de linfocitos NK. Datos expresados en media \pm EE.

10.3.3.4 Expresión del Receptor y Ligando de FAS (CD95+ y CD178+), TRAIL (CD253+) así como Caspasa 3 activa en linfocitos NK.

La frecuencia en la expresión del receptor de Fas sobre linfocitos NK en los Px fue 6 ± 3.5 y 0.7 ± 0.5 en los CT, respectivamente ($p < 0.01$) aumentando la expresión en los Px. En el grupo con A fue 7 ± 5.2 , 4 ± 2.5 en CH; la expresión del receptor se encontró aumentada en A y disminuida en CH, se encontraron diferencias entre A y CT, así como CH y CT (Figura 20a). Para el ligando de Fas, los Px tuvieron en promedio 21.3 ± 8.6 y 0.8 ± 0.4 en CT, observándose un aumento en los Px con diferencias significativas ($p < 0.05$), mientras que para el grupo con A obtuvo 11 ± 6 , 41.5 ± 20 en CH; aumentando su expresión en A y CH comparado contra los CT y observando diferencias significativas (Figura 20b). La expresión promedio de CD253+/TRAIL en los Px fue de 62.3 ± 9.7 y 48 ± 1.5 en CT, observando un aumento en la expresión en los Px ($p < 0.04$) en el grupo A fue 56 ± 11 , en CH 72.7 ± 20 ; se obtuvieron diferencias entre CH contra el grupo CT, teniendo mayor expresión en CH (Figura 20c). La expresión de Caspasa 3 activa promedio en los Px fue de 10 ± 6.5 y 0.2 ± 0.05 en el grupo CT ($p < 0.02$), en el grupo de A fue 14.5 ± 10 , en CH 0.9 ± 0.9 , se observa mayor expresión

en los Px, en el grupo con A presentándose diferencias significativas entre Px vs Ct y A vs CH (Figura 20d).

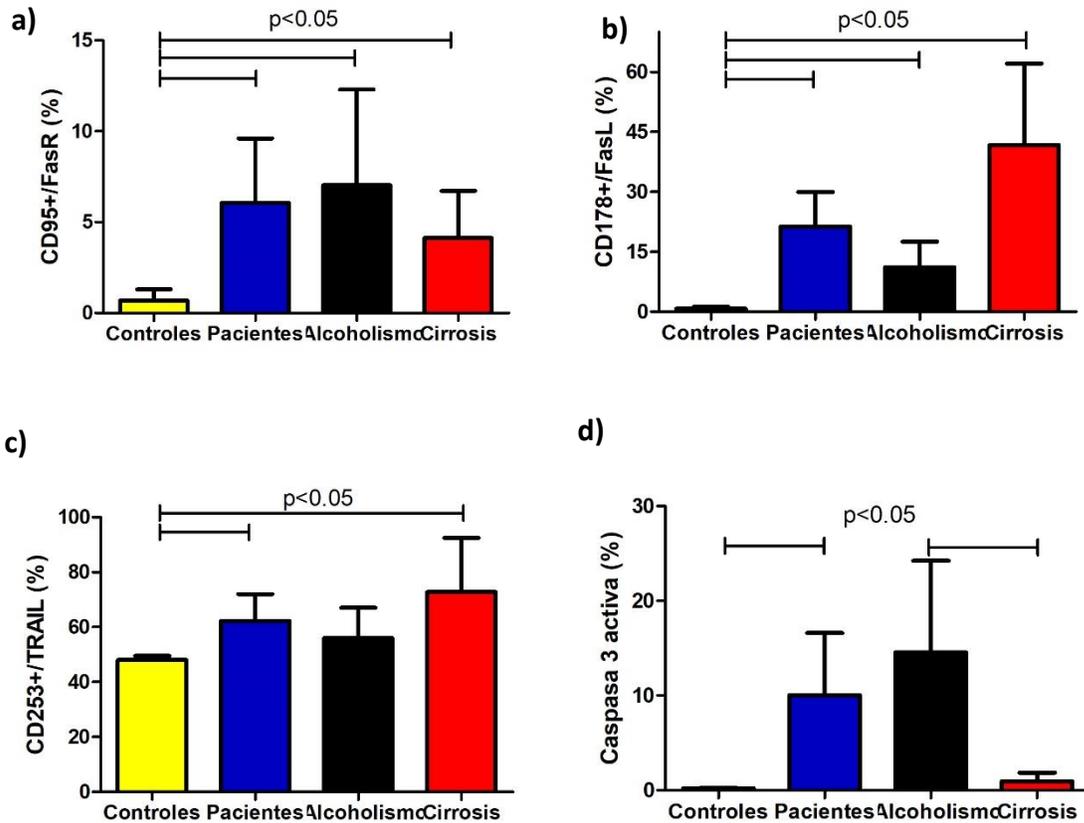


Figura 20. Expresión de moléculas de muerte sobre linfocitos NK. a, b) Frecuencia de linfocitos que expresan el receptor de Fas/CD95+ y ligando de Fas/CD178+; c) Frecuencia de linfocitos citotóxicos que expresan CD253+/TRAIL; d) Expresión de Caspasa 3 activa en linfocitos NK. Datos expresados en media ± EE.

10.3.3.5 Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos NK

La frecuencia en la expresión del receptor CXCR3 (CD183+) fue 7.4 ± 7 en Px, 0.03 ± 0.03 para A, 15 ± 14 en CH y 0.28 ± 0.16 en CT; no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figura 21a). En el receptor CXCR4 (CD184+), el promedio en Px fue 2 ± 1.8 , en A fue 0.07 ± 0.07 , en CH 3.7 ± 3 y en CT 0.18 ± 0.09 ; se observó un aumento en la expresión en el grupo CH se obtuvieron diferencias significativas entre CH comparados contra A y CT (Figura 21b).

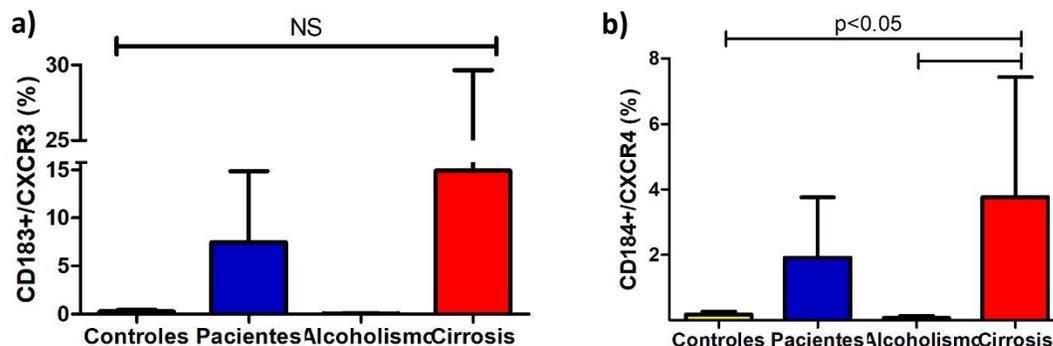


Figura 21. Expresión de receptores de quimiocinas sobre linfocitos NK. a-b) Frecuencia de células NK que expresan CD183+/CXCR3 y CD184+/CXCR4 en los grupos. Datos expresados en media \pm EE

10.3.4 Determinación de citocinas en suero

La mediana de la concentración de IL-6, IL-8 e IFN- γ aumentaron en los Px vs CT ($p < 0.001$); las concentraciones de IL-6 e IL-8 incrementaron en el grupo con A vs CT, la concentración de IL-6 es elevada en CH vs A y CT; sin embargo, IL-8, IL-10 e IFN- γ solo aumentaron en CH vs CT ($p = 0.003$, $p = 0.008$) (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de GM-CSF, TNF- α , IL-2 e IL-4.

Tabla 5. Concentraciones séricas en los grupos de estudio.

	Controles	Pacientes	Alcoholismo	Cirrosis
IL-6 (pg/mL)	0.4 (0.2-4.6)	2 (0.2-36) ^a	0.73 (0.2-3) ^b	4 (0.3-36) ^{c,d}
IL-8/CXCL8 (pg/mL)	1.3 (0.3-12.3)	8 (0.1-163) ^a	7 (0.6-54) ^b	9.4 (0.1-163) ^c
IL-10 (pg/mL)	0.4 (0.1-4.5)	1 (0.1-118.3)	0.3 (0.1-118.3)	1.1 (0.1-81) ^c
IFN- γ (pg/mL)	1 (0-21)	2 (0-173) ^a	1.5 (0.1-50.2)	18 (0-173) ^c

Datos expresados en mediana (min-máx). "a" Diferencia entre pacientes y controles; "b" Diferencia entre alcoholismo y controles; "c" Diferencia entre cirrosis y controles; "d" Diferencia entre alcoholismo y cirrosis. pg/mL: pico gramos por mililitro. GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. IFN- γ : Interferón gama. Interleucina (IL).

10.3.5 Asociaciones

Las asociaciones entre el consumo crónico de alcohol y parámetros inmunológicos se presentan a continuación (Tabla 6-8).

Tabla 6. Correlaciones de linfocitos T cooperadores.

	r_s	p
#CD4+ y g por día	-0.678	0.045 ^a
#CD4+ y #Linfocitos	0.904	0.001 ^a
#CD4+ y #CD8+	0.833	0.010 ^a
#CD4+ y #NK	0.757	0.049 ^a
#CD4+ e IL-6	-0.683	0.042 ^a
CD4+CD95+ y NK+CD178+	0.739	0.036 ^a
CD4+CD178+ y NK+CD178+	0.842	0.010 ^a
CD4+Caspasa 3 activa y NK+Caspasa 3 activa	0.9760	<0.001 ^a
CD4+CXCR4+ y NK+CXCR4+	0.756	0.049 ^a

r_s : Correlación de Spearman.

Tabla 7. Correlaciones de linfocitos T citotóxicos.

	r_s	p
#CD8+ y #Linfocitos	0.786	0.021 ^a
%CD8+ e IL-10	-0.559	0.007 ^a
CD8+CD95+ y CD4+CD95+	0.936	<0.001 ^a
CD8+CD178+ y CD4+CD178+	0.551	0.041 ^a
CD8+Caspasa 3 activa y CD4+Caspasa 3 activa	0.986	<0.001 ^a
CD8+CXCR3+ y CD4+CXCR3+	0.689	0.005 ^a

r_s : Correlación de Spearman.

Tabla 8. Correlaciones de linfocitos NK.

	r_s	p
#NK+ y #CD8	0.847	0.016 ^a
#NK y #Linfocitos	0.955	0.001 ^a
NK y TRAIL	0.850	0.004 ^a
NK y Granzima B	0.728	0.026 ^a
NK+Caspasa 3 activa y CD8+Caspasa 3 activa	0.929	<0.001 ^a
NK+CD25+ y CD8+CD25+	0.859	0.013 ^a
NK+NKG2D+ y CD8+CD25+	-0.708	0.033 ^a
NK+Granzima B+ y CD8+Perforina+	0.810	0.008 ^a
NK+CXCR4+ y CD8+CXCR4+	0.998	<0.001 ^a
NK+CXCR3+ y CD8+CXCR4+	0.997	<0.001 ^a

r_s : Correlación de Spearman.

11. DISCUSIÓN

El consumo crónico de alcohol se considera uno de los principales factores de riesgo para enfermar. Campollo O., 2007, estableció que una consideración metodológica para el estudio del alcoholismo se vincula con las limitaciones epidemiológicas y la presentación clínica de los sujetos. Ya que la mayoría de ellos acude a solicitar atención o ayuda sólo en etapas cuando ya se encuentra establecido el padecimiento. Por esta razón y para obtener más información sobre el trastorno, se debe analizar el problema de forma clínica, psicológica y psiquiátrica en diferentes grupos como son sujetos en apariencia sanos (estudiantes, hogares), grupos especiales (sujetos con cirrosis, grupos de autoayuda) y en los propios sujetos con alcoholismo que acuden a los servicios médicos por causas ajenas o relacionadas con un periodo de intoxicación (accidentes, salas de urgencias médicas).

En nuestro estudio se encontró que el 80 % de los pacientes estuvo conformado por hombres y el restante 20 % por mujeres, lo cual coincidió con lo reportado por la ENCODAT 2017, donde se determinó que la población masculina presenta un mayor consumo de alcohol. El grupo control estuvo conformado principalmente por mujeres; sin embargo, es importante mencionar que se observó una tendencia a la alza en el consumo crónico de alcohol en mujeres, esta alza está afectando sobre todo a los grupos etarios jóvenes (Cavareo-Anduaga, J. J., *et al*, 1999; ENCODAT, 2017).

Respecto a la edad, las poblaciones se localizaron dentro del rango de los 18 a 60 años, en donde observamos que en el grupo de cirrosis por alcohol presentó rangos de mayor edad, Rehm, J. y colaboradores en 2013, observaron que el número de muertes por cirrosis hepática atribuida al consumo crónico de alcohol es mucho mayor en personas que tienen 65 o más años (debido a complicaciones de la misma) en comparación con grupos de entre 15 a 34 años y las personas de 35 a menores de 65 años, tanto para hombres como mujeres. Sin embargo, en términos de contribución relativa, el impacto de la cirrosis hepática por alcohol es mayor en el grupo de mediana edad que abarca de los 35 a menores a 65 años. Esto es importante debido a que es la población económicamente activa la que está siendo más afectada.

En el IMC, el promedio en los tres grupos se ubicó entre el peso normal (18.5-24.9 Kg/m²) y el sobrepeso (25-29.9 Kg/m²), de acuerdo a lo descrito por la Organización Mundial de la Salud. Naveau, S. y colaboradores en 1997, identificaron que el exceso de peso corporal durante al menos 10 años sumado al consumo excesivo de alcohol, es considerado un factor de riesgo para desarrollar hepatitis alcohólica y cirrosis por alcohol aumentando la mortalidad por enfermedad hepática. Mientras que la presencia de obesidad fue un predictor independiente para el desarrollo de EHA.

En el AUDIT, el grupo con alcoholismo obtuvo una puntuación promedio de 20, de acuerdo a Babor, T. 2001 los sujetos que presentan puntuaciones iguales o mayores a 20 requieren una evaluación diagnóstica amplia de la dependencia del alcohol. Sin embargo, como sabemos estos sujetos no acuden a los servicios médicos debido a que no tienen conciencia de su padecimiento o tratan de minimizar u ocultar su problema (negación) (Martínez-Hernández, L. A., López-Carbajal, D. A., 2005). En el grupo con cirrosis el puntaje de AUDIT fue de 17, de acuerdo a Babor, 2001 las puntuaciones entre 16 y 19 sugieren terapia breve y un abordaje continuado, es importante mencionar que en esta etapa los pacientes con cirrosis presentan signos y síntomas relacionados a la misma como: hipertensión, ascitis etc. Para proporcionar descripciones claras de las categorías diagnósticas, con el fin de conocer si el individuo presenta algún trastorno de abuso o dependencia hacia el alcohol es necesario aplicar el cuestionario DSM-IV, en el grupo de alcoholismo y cirrosis todos los participantes dieron positivo a dependencia alcohólica.

El conocimiento acerca de un consumo de riesgo o perjudicial del alcohol puede ayudar en la identificación del consumo excesivo como causa de una enfermedad presente, proporcionando esquemas de intervención dirigida a los bebedores de riesgo para que puedan reducir o abandonar el consumo de alcohol y con ello evitar las consecuencias del mismo (Babor, T. *et al*, 2001). Por otra parte, el grupo control presentó valores de AUDIT menores a 8, de manera interesante algunos estudios han reportado que el consumo moderado de alcohol puede ser saludable y protege al individuo contra enfermedades cardiovasculares (Szabo, G. & Mandrekar, P., 2009).

De acuerdo a los gramos de alcohol consumidos por día, el grupo con cirrosis presentó puntajes altos con un consumo inicial a los 14 años el cual fue continuado durante 28 años, Campollo, O., 2007, reportó que en personas que desarrollaron cirrosis a consecuencia del consumo crónico de alcohol, el tiempo promedio de ingestión alcohólica para su desarrollo fue de 24 años con un inicio de la ingestión a los 18, por lo que pudimos observar que nuestra población de estudio se ubicó en estos parámetros aunque es importante mencionar que el inicio de la ingestión cada vez se inicia en etapas tempranas.

Los múltiples efectos patológicos del alcohol pueden ser divididos en aquellos que resultan del efecto directo del alcohol, los que surgen por efectos secundarios a las deficiencias nutricionales y los causados por la enfermedad hepática. Al examinar las pruebas bioquímicas entre los grupos se encontró que las concentraciones de Hb disminuyeron en el grupo con cirrosis, la anemia es una causa común en los sujetos con alcoholismo y cirrosis. Das, S. K. *et al*, 2008, reporta que la hemoglobina puede formar aductos con el acetaldehído (HAA) después de la ingesta de alcohol. Estos complejos de HAA, pueden ser detectables en el torrente sanguíneo y pueden estar presentes durante al menos 28 días en circulación por lo que puede ser usado como un biomarcador para el consumo crónico de alcohol.

El alcohol y sus metabolitos tienen efectos tóxicos en la médula ósea y, por lo tanto, también en la producción de precursores hematológicos. La macrocitosis (eritrocitos agrandados) es un hallazgo común en los alcohólicos crónicos y en déficits vitamínicos (vitamina B6, B12 y ácido fólico). La macrocitosis es determinada por el Volumen Corpuscular Medio (VCM) estimación promedio del volumen de eritrocitos en este estudio se observó que el VCM aumentó en el grupo con cirrosis. Debido a que el glóbulo rojo sobrevive por 120 días después de ser liberado hacia la circulación, el VCM puede permanecer elevado hasta 3 meses después de que una persona haya dejado de beber y si las concentraciones de GGT y VCM son elevadas, es probable que el alcohol fuese el agente causante (Das, S. K., *et al.* 2008; Torruelas, C. *et al.*, 2014).

En los pacientes con alcoholismo o cirrosis hepática por alcohol se describe también leucopenia con neutropenia (Homann, C. & Hasselbalch, H. C., 1992). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en el número de leucocitos circulantes aunque si se observó elevado el porcentaje de neutrófilos en el grupo con alcoholismo y cirrosis hepática. Los neutrófilos pueden infiltrarse al hígado promoviendo la progresión de EHA, produciendo daño en los hepatocitos a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno, proteasas y mediadores pro-inflamatorios. Por otro lado, los neutrófilos tienen la capacidad de contrarrestar las infecciones bacterianas por lo cual, los pacientes que tienen un menor número de neutrófilos en circulación pueden reflejar un sistema de defensa inmune deficiente y presentar una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas o virales (Gao, B. & Tsukamoto, H., 2016).

También, se observó que el porcentaje de monocitos en la periferia fue mayor en los sujetos con cirrosis, esto concuerda con lo reportado por Donnadieu-Rigole, H., *et al.*, 2016, en donde observaron que el uso crónico de alcohol altera la distribución, así como las características fenotípicas y funcionales de los monocitos de sangre periférica.

Se sabe que otra de las modificaciones causadas por el consumo crónico de alcohol es la disminución de linfocitos o linfopenia (Matos L., Batista P *et al.*, 2013), nuestros datos coincidieron con estas modificaciones en la disminución de linfocitos, mientras que el número total sólo estuvo disminuido en cirrosis.

Dentro de las anomalías hematológicas más comunes también se encuentra la trombocitopenia complicación frecuente en los alcohólicos y durante la cirrosis hepática, nuestros datos muestran que disminuyó el número de plaquetas en el grupo con cirrosis hepática. En un estudio con voluntarios, se demostró que durante la administración de alcohol con dieta normal, las plaquetas disminuían en la mitad de las personas después de tres a cinco semanas de consumo diario de alcohol (Lindenbaum J & Lieber CS, 1969). Adicionalmente, algunos estudios, han demostrado que la trombocitopenia en los alcohólicos se presenta como resultado de la supresión en la maduración de los megacariocitos a nivel medular (Latvala J, Parkkila S, Niemelä O., 2004; Violi F, Basili S, Raparelli V, Chowdary P, Gatt A *et al.*, 2011). Además, el alcohol es la causa más

importante de cirrosis y a través de ésta; es el origen de otras alteraciones en la coagulación por la insuficiencia hepática, así como el hiperesplenismo donde la hipertensión portal causa la acumulación y el secuestro de las plaquetas (Peck-Radosavljevic M., 2017).

Los marcadores de consumo de alcohol más utilizados son las enzimas AST, ALT y GGT, siendo AST y ALT las que se elevan con menos frecuencia que la GGT durante el consumo. En nuestros resultados se determinó que la concentración de AST, ALT y GGT se encontraron elevadas en los pacientes con alcoholismo y cirrosis hepática, lo cual coincidió con lo reportado por Atalo P. et al, 2008 en pacientes con consumo crónico de alcohol que fue AST 63 (U/L), ALT 67 (U/L) y GGT 177 (U/L). Así mismo, una característica común de la hepatopatía alcohólica crónica es la hipoalbuminemia progresiva, a nivel sérico también se atribuye al estado nutricional de los pacientes el cual es deficiente, este estudio expuso que las concentraciones de albúmina son menores en el grupo de cirrosis y esto concuerda con lo reportado en otros (Atalo P, 2008).

El alcoholismo se asocia con alteraciones significativas del sistema inmunológico lo que predispone a las personas a contraer infecciones virales, bacterianas y al desarrollo de cáncer. Sin embargo, es importante advertir que varios aspectos del consumo de alcohol y sus efectos sobre la inmunidad y defensa del huésped aún no se han aclarado por completo (Gyongyi S & Saha B, 2015); también, se desconoce lo que sucede con estos componentes durante la cirrosis hepática (Jeong Wl., Gao B, 2008).

En la población de linfocitos T cooperadores identificados por la expresión de moléculas CD3+CD4+, el porcentaje en el grupo control fue de 38 %, en los T citotóxicos (CD3+CD8+) y NK (CD3-CD56+) fue de 21 y 13 %, respectivamente. Razo D, García J y Llorente L, 1996 reportaron los intervalos de referencia obtenidos en una población adulta sana de la Ciudad de México, para CD4+ obtuvieron un estimado de 42%, para CD8+ un 26% y finalmente para NK fue 13 %. Con base a lo anterior, nuestras poblaciones celulares se encontraron dentro de los parámetros de referencia, validando nuestro análisis celular.

Durante el consumo crónico de alcohol en los linfocitos T cooperadores CD4+ disminuyó la expresión del receptor de IL-2 (CD25+) de activación y proliferación celular, el cual es mediado por la señalización del TCR, su expresión es detectable hasta el día 4-5 después de la unión, también disminuyó la expresión del receptor de activación temprana (CD69+), el cual es detectable a las pocas horas de la unión con el TCR, por lo que estas células no son activadas en la periferia, generando anergia e impidiendo su diferenciación hacia células efectoras, también se inhibe su capacidad para activar otras células como los macrófagos, linfocitos B y en la producción y secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias.

Sin embargo, en las células T cooperadoras el número de células y otras características fenotípicas como la viabilidad celular, moléculas de muerte y tráfico celular no se observaron cambios durante el consumo crónico de alcohol (Figura 22).

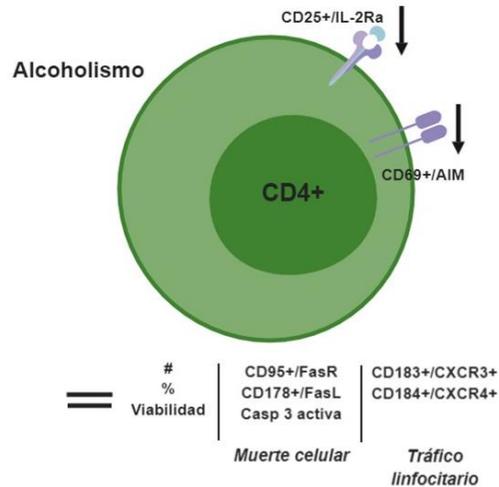


Figura 22. Características fenotípicas de los linfocitos T cooperadores en pacientes con Alcoholismo. Se observa la disminución en la expresión de marcadores de activación CD25+/IL-2Ra y CD69+/AIM (flecha negra hacia abajo), en la parte inferior del esquema se encuentran las características celulares que no presentaron modificaciones.

En la cirrosis hepática por alcohol, el número de células T cooperadoras se observan disminuidos de acuerdo a lo observado por Cook et al. 1994, Zhang and Meadows 2005, Costa Matos et al, 2013 indican que, durante la cirrosis hepática se reducen los números de linfocitos en periferia, siendo los CD4+ uno de los afectados; además del número el daño hepático por alcohol disminuye la viabilidad celular hasta en un 50 % aproximadamente.

En las células T CD4+ aumenta la expresión del receptor de IL-2 (CD25+) de activación y proliferación celular, y disminuye el receptor de activación temprana (CD69+), por lo que la activación de estas células es deficiente en el daño hepático.

En los marcadores de muerte celular se observa un aumento en la expresión del receptor de Fas/CD95+ el cual, transmite la señal de muerte desde la superficie a vías intracelulares en donde las células T cooperadoras pueden sufrir apoptosis, la expresión de esta molécula es crucial en el destino de los linfocitos efectoras. La expresión del ligando de Fas/CD178+ aumenta en los linfocitos CD4 que son activados, si el ligando no es escindido de la superficie celular puede inducir apoptosis en células que expresan altas cantidades del receptor de Fas sobre la superficie celular. Los linfocitos no son las únicas células que expresan Fas, sino también los hepatocitos, colangiocitos, células estelares activadas y células de Kupffer.

Cuando hay daño hepático se incrementa la expresión de CXCR3/CD183+, de acuerdo a su clasificación funcional esta molécula interviene en procesos inflamatorios, presenta 3 ligandos como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 que son expresados por células no parenquimales hepáticas; durante el daño hepático las células T cooperadoras pueden ser reclutadas a tejido para mediar el microambiente inflamatorio llevado a cabo principalmente por CXCR3.

No se observan cambios en otras características fenotípicas como el porcentaje celular y la expresión de caspasa 3 activa sobre las células T cooperadoras (Figura 23).

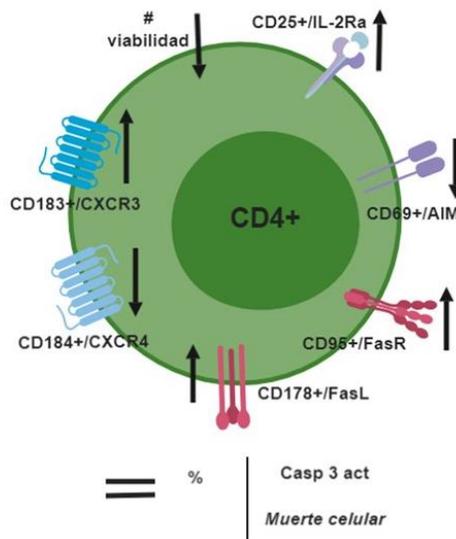


Figura 23. Características fenotípicas de los linfocitos T cooperadores en pacientes con cirrosis hepática por alcohol. Se observan modificaciones en frecuencia absoluta, viabilidad, activación CD25+/IL-2Ra, CD69+/AIM, muerte CD95+/FasR, CD178+/FasL, CD253+/TRAIL, Caspasa 3 activa y tráfico linfocitario CD183+/CXCR3, CD184+/CXCR4. En la parte inferior del esquema se encuentran las características celulares que no presentaron modificaciones (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

Durante el consumo crónico de alcohol en los linfocitos T citotóxicos CD8+ disminuye la expresión del receptor de activación temprana (CD69+) sin embargo, aumenta la expresión de NKG2D (CD314+) el cual es necesario junto con el TCR para reconocer, detectar y eliminar células infectadas o transformadas, ya que sus ligandos son inducibles bajo estrés celular o ya sea como resultado de una infección.

La capacidad citotóxica de las células T aumenta con la expresión de perforina intracelular en los pacientes que presentan un consumo crónico de alcohol, por lo que actúa en la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos en las membranas celulares blanco; sin embargo, para una destrucción eficaz son necesarias ambas perforina y granzima B; por lo que la capacidad efectora citotóxica es deficiente.

De acuerdo a la expresión de receptores de muerte celular, aumenta la expresión del ligando de Fas (CD178+), el cual puede inducir apoptosis en otras células que expresan altas cantidades del receptor de Fas sobre la superficie celular. Se observa que disminuye la expresión de TRAIL (CD253+) otra vía de inducción de apoptosis la cual, no está participando durante el consumo crónico de alcohol.

No se observan cambios en otras características como el número, porcentaje, viabilidad, expresión del marcador de activación CD25+, capacidad efectora por granzima B, muerte por el receptor de Fas y la activación de caspasa 3 así como el tráfico celular mediado por CXCR3 y CXCR4 (Figura 24).

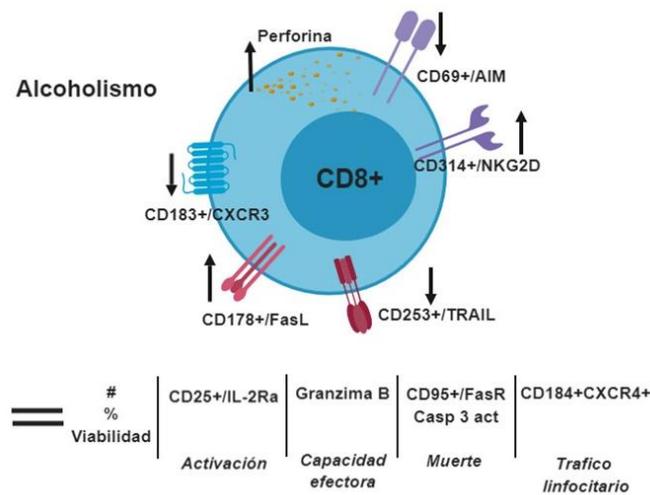


Figura 24. Características fenotípicas de los linfocitos T citotóxicos en pacientes con alcoholismo. Se observan modificaciones en activación CD69+/AIM, CD314+/NKG2D, capacidad efectora en perforina y muerte celular CD178+/FasL, CD253+/TRAIL. En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modifican por el consumo crónico de alcohol (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

En la cirrosis hepática por alcohol, el número de células T citotóxicas se observan disminuidas, de acuerdo a lo observado por Cook et al. 1994, Zhang and Meadows 2005, Costa Matos et al, 2013 indican que, durante la cirrosis hepática se reducen los números de linfocitos en periferia; además en el daño hepático por alcohol disminuye la viabilidad celular hasta en un 50 % aproximadamente.

En las células T citotóxicas aumenta la expresión de NKG2D (CD314+), molécula necesaria junto con el TCR para activar, reconocer, detectar y eliminar células infectadas o transformadas, ya que sus ligandos son inducibles bajo estrés celular, o como resultado de una infección.

La capacidad efectora de los linfocitos T citotóxicos es completa, ya que aumentó la expresión de granzima B y perforina intracelular en los pacientes que presentan cirrosis hepática.

De acuerdo a la expresión de receptores de muerte celular, aumentó la expresión del receptor de Fas (CD95+) el cual, transmite la señal de muerte desde la superficie a vías intracelulares causando la muerte por apoptosis de las células T citotóxicas, la expresión de esta molécula es crucial en el destino de los linfocitos efectores. Se observó una disminución en la expresión del ligando de Fas (CD178+) y TRAIL (CD253+) estas vías de inducción de apoptosis no participan durante la cirrosis hepática por alcohol.

Cuando hay daño hepático se incrementó la expresión de CXCR3/CD183+, durante el daño hepático las células citotóxicas CD8+ pueden ser reclutadas a tejido para participar en el microambiente inflamatorio.

No se observaron cambios en otras características fenotípicas como activación celular, activación de caspasa 3 y el tráfico linfocitario por CXCR4 en las células T citotóxicas (Figura 25).

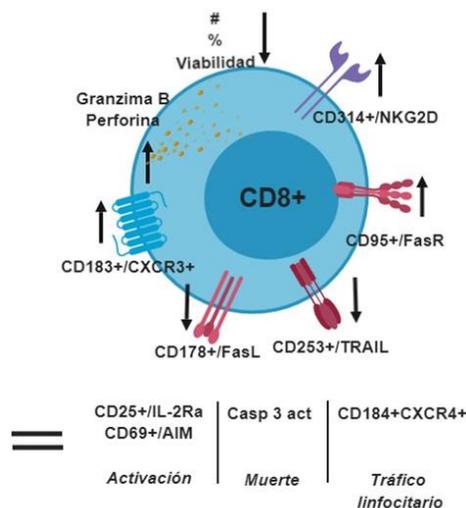


Figura 25. Características fenotípicas de los linfocitos T citotóxicos en pacientes con cirrosis hepática por alcohol. Se observan modificaciones en frecuencia absoluta y relativa, viabilidad, activación CD314+/NKG2D, capacidad efectora en granzima B, perforina, muerte CD95+/FasR, CD178+/FasL, CD253+/TRAIL y tráfico linfocitario CD183+/CXCR3. En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modificaron por el daño hepático (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

En el consumo crónico de alcohol, la expresión del marcador de activación y proliferación celular (CD25+) se encontró aumentado en las células NK, esta activación no es completa ya que la expresión del receptor de activación temprana (CD69+) disminuye, por lo que, la activación celular es deficiente.

De acuerdo a la expresión de receptores de muerte celular, podemos observar que durante el consumo crónico de alcohol aumentó la expresión del receptor y ligando de Fas, así como caspasa 3 activa, por lo tanto, las células NK presentaron apoptosis.

Sin embargo, no se observaron cambios en el número, porcentaje y otras características fenotípicas como la viabilidad celular, activación por NKG2D, capacidad efectora, muerte mediada por TRAIL y el tráfico de las células NK en pacientes con consumo crónico de alcohol (Figura 26).

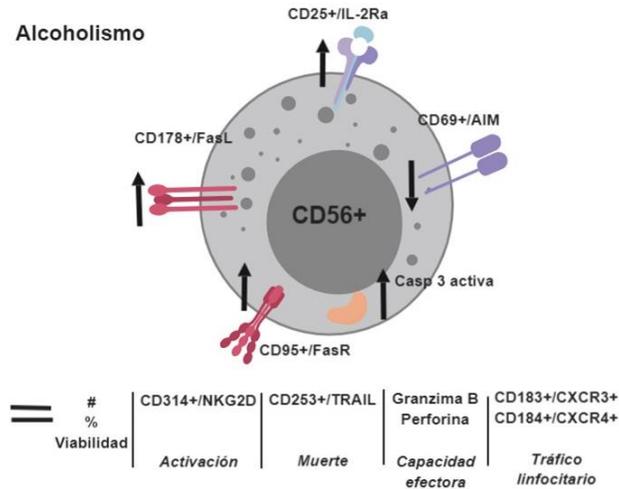


Figura 26. Características fenotípicas de los linfocitos NK en pacientes con alcoholismo. Se observan modificaciones en activación CD25+/IL-2Ra, CD69+/AIM y muerte celular CD95+/FasR, CD178+/FasL, Caspasa 3 activa. En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modifican por el consumo crónico de alcohol (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

En el daño hepático por alcohol, el número de células NK se observaron disminuidas de acuerdo a las observaciones hechas por Cook et al. 1994, Zhang and Meadows 2005, Costa Matos et al, 2013 indican que durante la cirrosis se reducen los números de linfocitos en periferia.

En las células NK, la expresión de marcadores de activación y proliferación celular CD25+ y CD69+ se encontraron aumentados durante la cirrosis hepática, por lo que la activación fue completa; mientras que la expresión de NKG2D fue reducida.

Durante el daño hepático se mantiene la expresión de granzima B y perforina, en ambas condiciones las células NK tienen la misma capacidad funcional para producir muerte sobre las células blanco.

De acuerdo a la expresión de receptores de muerte celular extracelular, podemos observar que durante la cirrosis hepática aumentó la expresión del receptor, ligando de Fas y TRAIL por lo cual, estas células pueden inducir muerte sobre las células blanco, así como ser susceptibles a que ellas mueran por apoptosis.

En la población de células NK cuando hay daño hepático generado por el consumo de alcohol se incrementa la expresión de CXCR4, esta molécula se considera homeostática y angiogénica y se expresa por estímulos pro-inflamatorios.

En cuanto al porcentaje, viabilidad celular, muerte por caspasa 3 activa y tráfico linfocitario por CXCR3+ de las células NK, no se observaron diferencias significativas (Figura 27).

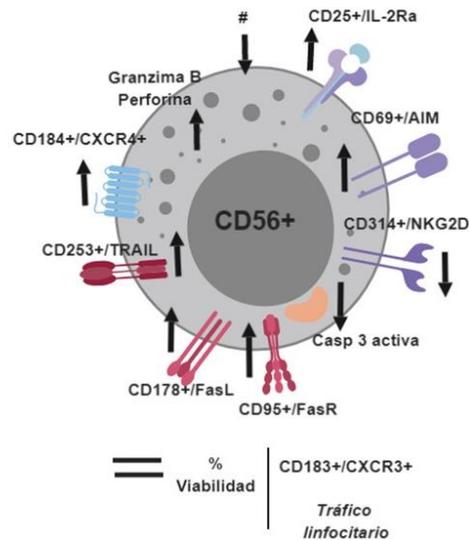


Figura 27. Características fenotípicas de las células NK en pacientes con cirrosis hepática por alcohol. Se observan modificaciones en frecuencia absoluta, activación CD25+/IL-2Ra, CD69+/AIM, CD314+/NKG2D, capacidad efectora en granzima B, perforina, muerte celular CD95+/FasR, CD178+/FasL, CD253+/TRAIL y tráfico linfocitario CD184+/CXCR4. En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modifican por el daño hepático (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

El consumo crónico de alcohol tiene efectos diversos en la respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa. Estos efectos pueden perjudicar las defensas del cuerpo contra una amplia variedad de patógenos incluidos los virus, las bacterias y pueden afectar los tejidos como el hígado.

Los efectos del alcohol en la respuesta inmune innata promueven reacciones inflamatorias, que pueden contribuir al daño tisular. Las alteraciones relacionadas con la respuesta inmunitaria adaptativa generan que el organismo sea más vulnerable a las infecciones virales y bacterianas, lo que contribuye a una progresión más grave o acelerada de la enfermedad. Además, la desregulación de la respuesta inmunológica normal causada por el consumo crónico de alcohol puede contribuir a que la activación, capacidad efectora y muerte celular de las diferentes subpoblaciones linfocitarias sean deficiente, incompleta o exacerbada, lo que propicia que estos pacientes sean susceptibles a presentar deficiencias inmunológicas (Figura 28).

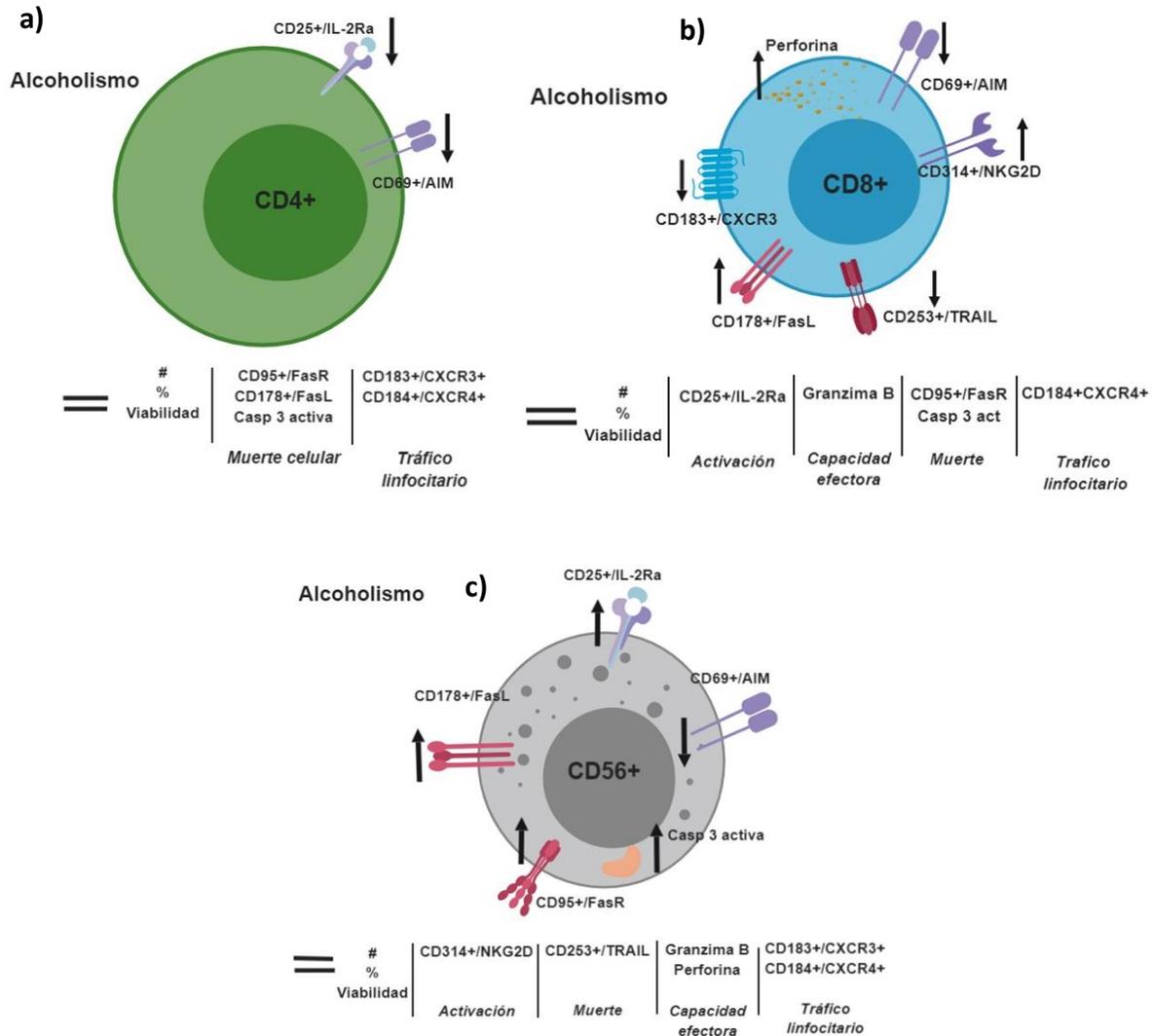


Figura 28. Cambios fenotípicos observados en los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK de pacientes con Alcoholismo. **a)** Se observan cambios en la expresión de receptores de activación CD25+/IL-2Ra, CD69+/AIM (morado) en la fracción T cooperadora, **b)** en T citotóxicos la activación temprana mediada por CD69+/AIM y CD314+/NKG2D (morado) se modifican, en la capacidad efectora se observa la expresión de perforina (amarillo) y en muerte celular CD178+/FasL y CD253+/TRAIL (rojo); **c)** en las células NK la activación celular mediada por CD69+/AIM y CD25+/IL-2Ra (morado) es diferencial, finalmente en muerte celular aumenta la expresión de CD95+/FasR, CD178+/FasL y Caspasa 3 activa (rojo). En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modifican por el consumo crónico de alcohol (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

Durante la cirrosis hepática debido al consumo crónico de alcohol, puede modular las funciones de las diferentes subpoblaciones celulares afectando la frecuencia, la viabilidad, las funciones lo que causa una interferencia en la respuesta inmunológica básica. Sin embargo, a diferencia de otros mecanismos el consumo de alcohol genera una inmunosupresión clínica que se vuelve significativa en caso de un insulto secundario. Por ejemplo, el consumo crónico de alcohol

aumenta el riesgo y la gravedad de las infecciones crónicas ya sean gastrointestinales o respiratorias, lo anterior aunado al déficit en el funcionamiento de las mismas (Figura 29).

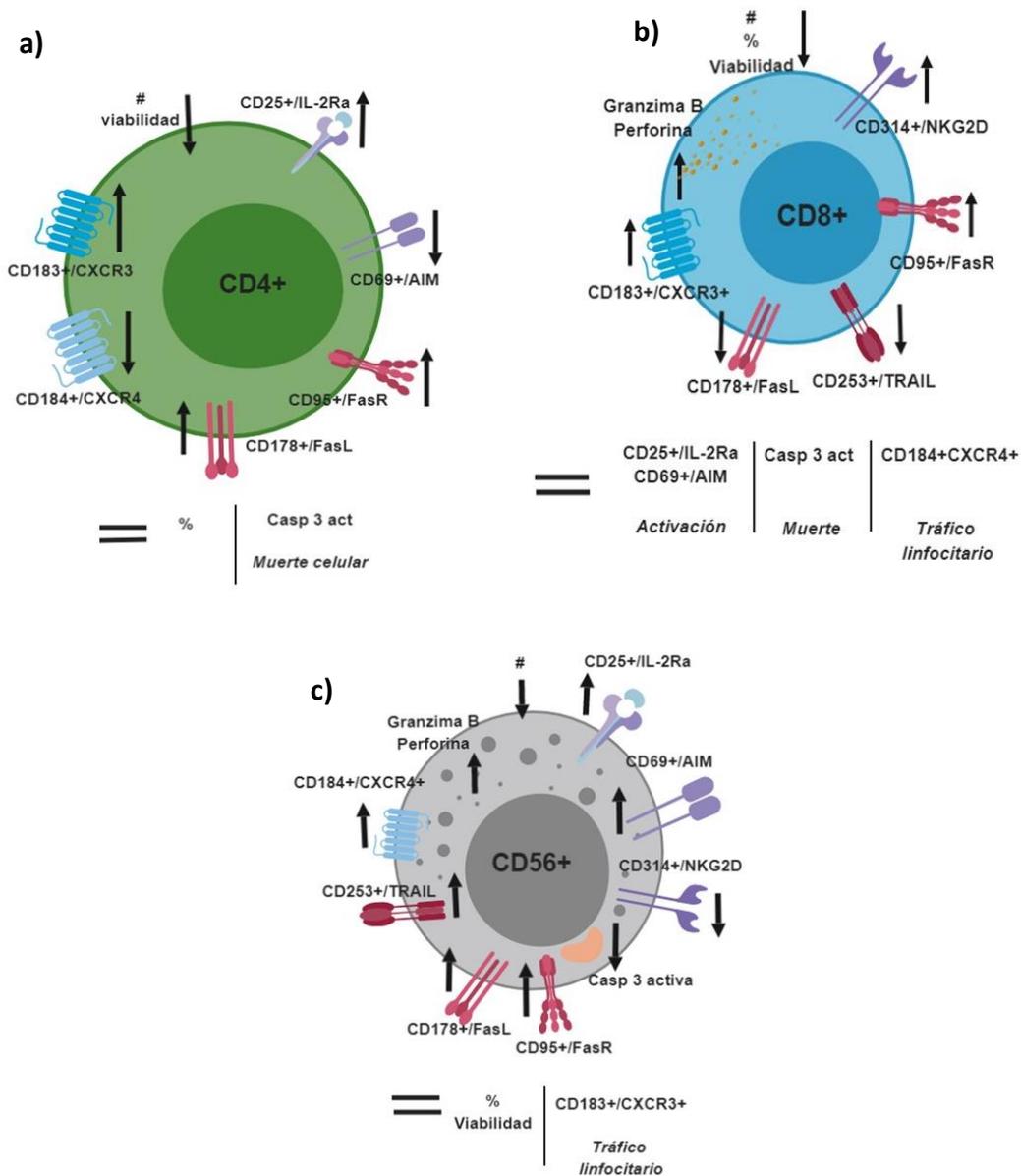


Figura 29. Cambios fenotípicos observados en los linfocitos T-CD4, T-CD8 y NK de pacientes con cirrosis hepática por alcohol. **a)** Se observan cambios en el número, la viabilidad y en la expresión de receptores de activación como CD69+/AIM y CD25+/IL-2Ra (morado); en muerte celular aumenta la expresión de CD95+/FasR y CD178+/FasL (rojo). Durante el tráfico linfocitario se modifica la expresión de CD183+/CXCR3 y CD184+/CXCR4+ (azul) en la fracción T cooperadora. **b)** En los linfocitos T citotóxicos el número, porcentaje y viabilidad se ven afectados, en activación celular aumenta la expresión de CD314+/NKG2D (morado), en la capacidad efectora se observa la expresión de

granzima B y perforina (amarillo), en muerte celular se modifica la expresión de CD95+/FasR, CD178+/FasL y CD253+/TRAIL (rojo) y en el tráfico linfocitario, estas células expresan CD183+/CXCR3 (azul); por el contrario, **c**) en las células NK disminuye su número y se observan cambios en la expresión de receptores de activación como CD25+/IL-2Ra, CD69+/AIM y CD314+/NKG2D (morado), en la capacidad efectora aumenta la expresión de Granzima B y perforina (gris), en muerte celular aumenta la expresión de CD95+/FasR, CD178+/FasL y CD253+/TRAIL (rojo) y finalmente en el tráfico linfocitario se expresa CD184+/CXCR4. En la parte inferior del esquema se muestran las características celulares que no se modifican durante la cirrosis hepática (Flecha negra hacia arriba = aumento en la expresión, flecha hacia abajo = disminución en la expresión).

El alcoholismo disminuye la activación celular de las células T-CD4+.

El alcoholismo modifica la activación, capacidad efectora, muerte y tráfico linfocitario de las células T-CD8+.

El alcoholismo modifica la activación y muerte de las células NK.

El alcoholismo promueve el microambiente pro-inflamatorio que es mediado por IL-6 e IL-8/CXCL-8.

La presencia de cirrosis hepática disminuye el número, la viabilidad, modifica de forma diferencial la activación celular, aumenta la muerte y el tráfico de las células T-CD4+.

Durante el daño hepático disminuye el número, porcentaje, viabilidad, afecta de forma diferencial la activación, muerte, el tráfico linfocitario y aumenta la capacidad efectora de las células T-CD8+.

En la cirrosis hepática por alcohol disminuye el número y afecta de forma diferencial la activación y tráfico linfocitario, aumentando la capacidad efectora y la muerte de las células NK.

Las poblaciones celulares que son afectadas son las citotóxicas como las células T-CD8 y NK.

El grupo de pacientes que presentan más daño en las diferentes subpoblaciones linfocitarias generado por el consumo crónico de alcohol son los pacientes con cirrosis.

Las concentraciones de citocinas en suero como: IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ aumentan en el grupo con cirrosis hepática participando de forma diferencial y mediando los efectos pro-inflamatorios producidos por el daño.

12. CONCLUSIONES

Durante el alcoholismo las características que se modifican son: la activación, capacidad efectora y muerte celular, es decir se afectan algunas funciones de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. En cuanto a las citocinas el ambiente pro-inflamatorio participa de forma activa a pesar de no presentarse modificaciones en las pruebas de función hepática. Sin embargo, las alteraciones se manifiestan en mayor número en pacientes con cirrosis hepática afectando las funciones de las tres poblaciones de linfocitos, principalmente en células citotóxicas como: T-CD8 y NK, así como los mediadores celulares pro y anti-inflamatorios. Con base en nuestros resultados, las alteraciones en las diferentes poblaciones linfocitarias permitirán el desarrollo de nuevas herramientas que puedan modular el sistema inmunológico y que además sirvan de apoyo en el pronóstico de los pacientes, ya que nos permitirá discernir la población celular más afectada para así orientar el tratamiento empleado, ya que los pacientes con cirrosis son susceptibles a las infecciones virales y/o bacterianas.

13. PERSPECTIVAS

Los mecanismos celulares alterados en las diferentes poblaciones linfocitarias y los mediadores participantes observados en nuestro estudio, permitirán el desarrollo de nuevas herramientas que promuevan la modulación del sistema inmunológico, debido a la falta de tratamientos que nos permitan reducir los efectos negativos hacia el mismo y que además sirvan de apoyo al pronóstico, susceptibilidad y tratamiento de los pacientes con alcoholismo y cirrosis hepática.

Sin embargo, aún falta profundizar a cerca del funcionamiento directo y compuesto de las diferentes poblaciones celulares con las células del parénquima y no parénquima hepático, así como a los estímulos externos que son expuestos los linfocitos durante el desarrollo del alcoholismo y cirrosis hepática. Por ejemplo, en el estudio de las células T sería interesante observar la expresión de otras moléculas de activación CD28 o inhibición de la activación CTLA-4 y que otras células puedan estar participando en este mecanismo.

De manera interesante, se podría estudiar la expresión de ligandos como MIC-A y MIC-B sobre otros leucocitos y células que pudieran estar mediando la activación, capacidad efectora y la inducción de muerte de las células T-CD8+ sobre otras.

Otro punto a conocer es: ¿Cuál es el efecto ejercido por PAMPs y/o DAMPs sobre las subpoblaciones linfocitarias?, ¿Cuál de ellos es más fuerte o si sinergizan sus efectos sobre las subpoblaciones de células T y NK?

14. REFERENCIAS

- Alhomsi, K., Selig, M., Sustic, T., et al. (2008) Induction of apoptosis and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells by fatty acid ethyl esters. *Alcohol Clin Exp Res* 32(3):534-543.
- Arteel, G. (2008). Silencing a killer among us. Ethanol impairs immune surveillance of activated stellate cells by natural killer cells. *Gastroenterology*. 134:351-353.
- Babor, T., Higgins, J., Saunders, J., Monteiro, M. (2001). AUDIT Cuestionario de identificación de los trastornos debidos al consumo de alcohol: Pautas para su utilización en la atención primaria. WHO/MSD/MSB01.6a. Organización Mundial de la Salud. Consultado en http://www.who.int/substance_abuse/activities/en/AUDITmanualSpanish.pdf
- Barr, T., Helms, C., Grant, K., Messaoudi, I. (2016). Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* Feb 4; 65: 242-51. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.001.
- Batallas, Z. K., Cook, R., Shey, M., Coleman, R. (2012). A dynamic flux in natural killer cells subsets as a function of the duration of alcohol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res*. 36(5):826-834.
- Bataller, R., Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* Feb; 115(2): 209-18.
- Campisi, J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental Gerontology* 38: 5-11.
- Campollo, O. (2007). Capítulo 16. El alcoholism en México En Hepatología: Desde la biología molecular al diagnóstico, tratamientos y prevención. Editorial Mc Graw Hill, México. Págs. 181-187.
- Cavareo-Anduaga, J. J., Colmenares-Bermúdez M. C., Saldivar-Hernández G. J. (1999). Diferencias por género en el consumo de alcohol en la Ciudad de México. *Salud Pública Mex* 41: 177-188.
- Ceni, E., Mello, T., Galli, A. (2014). Pathogenesis of alcoholic liver disease: rol of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* Dec 21; 20(47): 17756-72. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17756.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. Aug 15; 326 (Pt 1):1-16.
- Comisión Nacional contra las Adicciones (2017) Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Alcohol. 1ª Edición. México.
- Cook, R. T., Schlueter, A. J., Coleman, R.A., Tygrett, L., Batallas, Z. K., Jerrells, T. R., Nashelsky, M. B., Ray, N. B., Haugen, T. H., Waldschmidt, T. J. (2007) Thymocytes, pre-B cells, and organ changes

in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol Clin Exp Res* 31(10):1746-1758.

Das, S. K., dhanya, L., Vasudevan, D. (2008). Biomarkers of alcoholism: an updated review. *Scand J Clin Lab Invest* 68(2):81-92.

Dawson, D. A. (2011) Defining risk drinking. *Alcohol Res Health* 34(2):144-156.

Donnadieu-Rigole, H., Mura, T., Portales, P., Duroux-Richard, I., Bouthier, M., Eliaou, J. F., Perney, P., Apparailly, F. (2016). Effects of alcohol withdrawal on monocyte subset defects in chronic alcohol users. *J Leukoc Biol* Nov; 100(5): 1191-1199.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516.
Encuesta Nacional de Adicciones: Reporte de Alcohol (ENA) (2011). Instituto Nacional de Salud México.

Friedman, S. L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* May; 134(6): 1655-69. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.003.

Galicia-Moreno, M., Gutiérrez-Reyes, G. (2014). The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Rev Gastroenterol Mex* Apr-Jun; 79(2): 135-44. doi: 10.1016/j.rgmx.2014.03.001.

Gao B., Radaeva S., Park O. (2009). Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 86(3):513-28.

Gao, B. & Tsukamoto, H. (2016). Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology* Jun; 150(8): 1704-9. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.025.

Gao, B., Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141(5):1572-1585. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.002.

Gershwing, M., Vierling, J., Manns, M. (2007). Liver immunology principles and practice. Publishing house Humana press. Printed in United States of America. Pag 40-82.

Goral, J., Karavitis, J., Kovacs, E. J. (2008). Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol*. 42(4):237-247. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.02.003.

Helm, R., Wheeler, G., Burks, A., Hakkak, R. and Badger, T. (1996). Flow cytometric analysis of lymphocytes from rats following chronic ethanol treatment. *Alcohol*. 13(5): 467-471.

Hill, M., Adrain, C., Duriez, P., Creagh, E., Martin, S. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23: 2134-2145.

Hoek, J. B., Pastorino, J. G. (2002) Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 27(1):63-68.

Hoek, J. B., Pastorino, J. G. (2004). Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage. *Semin Liver Dis* 24(3):257-272.

Homann, C. & Hasselbalch, H. C. (1992). Hematological abnormalities in alcoholism. *Ugeskr Laeger* Aug 3; 154(32): 2184-7.

Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S. and Livingston, E. (2007). Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 139: 143-156.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2017). Consultado en <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Jeong, W. I., Park, O., Gao, B. (2008). Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 134(1):248-258.

Jerrells, T. R., Joe, S., Domiati, R. (1992). Effects of ethanol on parameters of cellular immunity and host defense mechanism to infectious agents. *Alcohol*. 9:459-463.

Kerr, J., Wyllie, A., Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.

Lee, U. E., Friedman, S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Clin Gastroenterol*. Apr; 25(2): 195-206. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.005.

Liangpunsakul, S., Haber, P., McCaughan, G. W. (2016). Alcoholic liver disease in Asia, Europe, and North America. *Gastroenterology* 150(8):1786-97. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.043.

Marsik, C., Halama, T., Cardona, F., Wlassits, W., Mayr, F., Pleiner, J., Jilma, B. (2003). Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock*. Dec; 20(6): 493-6.

Martínez-Hernández L. A. & López-Carbajal, M. J., Armengol-Agis, D. (2005). Intervención del médico familiar en alcoholismo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 44(2): 181-188.

Masson, S., Emmerson, I., Henderson, E., Fletcher, E. H., Burt, A. D., Day, C. P., Stewart, S. F. (2014). Clinical but not histological factors predict long-term prognosis in patients with histologically advanced non-decompensated alcoholic liver disease. *Liver Int* Feb; 34(2): 235-42. doi: 10.1111/liv.12242.

Mathurin, P., Bataller, R. (2015). Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *J Hepatol* Apr; 62(1 Suppl): S38-46. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.006.

Medina-Mora, M., Villatoro-Velázquez, J., Téllez-Rojo, M. (2012). Encuesta Nacional de Adicciones. Reporte de Alcohol.

Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S., Taniguchi, N. (1992). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol*. Dec 1; 149(11): 3753-8.

Mumenthaler, M. S., Taylor, J. L., O'Hara, R., Yesavage, J. A. (1999). Gender differences in moderate drinking effects. *Alcohol Res Health*. 23(1): 55-64.

Muñoz Espinoza, L. (2007). Hepatología: Desde la biología molecular al diagnóstico, tratamiento y prevención. Editorial Mc Graw Hill. México. 181-187.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009). Inmunobiología de Janeway 7ª Edición. Editorial Mc Graw Hill México D.F. Págs. 887.

Nagy, L. E. (2015). The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Res* 2015; 37(2):237-50.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) (2017). Drinking levels defined. Consultado en <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>

Naveau, S., Giraud, V., Borotto, E., Aubert, A., Capron, F., Chaput, J. C. (1997). Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. Jan; 25(1): 108-11.

Ogawa, S., Sakaguchi, K., Takaki, A., Shiraga, K., Sawayama, T., Mouri, H., Miyashita, M., Koide, N., Tsuji, T. (2000). Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol*. Jan; 15(1):69-75.

Organización Mundial de la Salud (2015). Alcohol Nota descriptiva N°349. Consultado en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/> Acceso 28 de Agosto 2017.

Organización Mundial de la Salud. Reporte Mundial de la Salud (2003). Consultado en <http://www.who.hr/whr>

O'Shea, R. S., Dasarathy, S., McCullough, A. J. (2010). Alcoholic liver disease. Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Hepatology* Jan; 51(1):307-28. doi: 10.1002/hep.23258.

Osna, N. A., Donohue T. M. Jr., Kharbanda K. K. (2017). Alcoholic liver disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res.* 38(2): 147-161.

Panasiuk, A., Perfieniuk, A., Flisiak, R. (2010). Association among Fas expression in leucocytes, serum Fas and Fas-ligand concentrations and hepatic inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* Mar; 30(3): 472-8. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02159.x.

Phelan, M. (1998). Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley Inter Science.

Philippe, M. and Bataller, R. (2015). Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* Apr; 62(1 Suppl): S38-46. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.006.

Pinzani, M. (2015). Pathophysiology of liver fibrosis. *Dig Dis.* 33(4): 492-7. doi: 10.1159/000374096.

Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., et al. (2006) Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 130(2):435-452.

Rehm, J., Samokhvalov, A. V., Shield, K. D. (2013). Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 59:160-168. 10.1016/j.jhep.2013.03.007.

Res, C. & Kaser, S. (2016). Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol* Jan 28;22(4):1664-73. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1664.

Rockey, D. C., Bell, P. D., Hill, J. A. (2015). Fibrosis- A common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* Mar 19; 372(12): 1138-49. doi: 10.1056/NEJMra1300575.

Saelens, X., Festjens, N., Vande, W., Van Gorp, M., Van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.

Schwartz, J. M., Reinus, J. F. (2012). Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. Nov; 16(4): 659-66. doi: 10.1016/j.cld.2012.08.001.

Spanagel, R. (2009). Alcoholism: A system approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89: 649-705. doi: 10.1152/physrev.00013.2008.

Spiering, M. J. (2015). Primer on the immune system. *Alcohol Res*. 37(2): 171-5.

Stickel, F., Datz, C., Hampe, J., Bataller, R. (2017). Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: Update. *Gut Liver* Mar 15; 11(2): 173-188. doi: 10.5009/gnl16477.

Szabo, G. & Mandrekar, P. (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* Feb; 33(2):220-32. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x.

Szabo, G. (1999) Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 34(6):830-841.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*. 7: 94-100.

Theise, N. D. (2013). Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease*. Vol. 2, No. 2: 64-67.

Toosi, A. E. (2015). Liver fibrosis: Causes and methods of assessment, A review. *Rom J Intern Med* Oct-Dec; 53(4): 304-14.

Torruellas, C., French, S. W. Medici, V. (2014). Diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* Sep 7;20(33): 11684-99. doi: 10.3748/wjg.v20.i33.11684.

Vidali, M., Stewart, S. F., Albano, E. (2008) Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury. *Trends Mol Med* 14(2):63-71.

Wang, Z. G., Dou, X. B., Zhou, Z. X., Song Z. Y. (2016). Adipose tissue-liver axis in alcoholic liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* Feb 15; 7(1):17-26. doi: 10.4291/wjgp.v7.i1.17.

World Health Organization (2018). Consultado en <http://www.who.int/gho/alcohol/en/> Acceso 10 de Diciembre 2017.

Zakhari, S., Li, T. K. (2007). Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* 46(6):2032-2039.

Zembruski, N. C., Stache, V., Haefeli, W. E., Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* Oct 1; 429(1): 79-81. doi: 10.1016/j.ab.2012.07.005.

Zhang, H., Meadows, G. G. (2008). Chronic alcohol consumption perturbs the balance between thymus-derived and bone marrow-derived natural killer cells in the spleen. *J Leukoc Biol* 83(1):41-47.

Zhang, H., Zhu, Z., Zhang, F., Meadows, G. G. (2015). Alcohol consumption and antitumor immunity: dynamic changes from activation to accelerated deterioration of the immune system. *Adv Exp Med Biol* 815: 313-31. doi: 10.1007/978-3-319-09614-8_18.

Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2001). Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). Current Protocols in Cell Biology. USA: Wiley Inter Science.

Zwolak, A., Surdacka, A, Daniluk, J. (2016). Bcl-2 and Fas expression in peripheral blood leukocytes of patients with alcoholic and autoimmune liver disorders. *Hum Exp Toxicol* Aug; 35(8): 799-807. doi: 10.1177/0960327115607078.

15. ANEXOS

15.1 Anexo 1. Consentimiento informado.



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"
DIRECCION GENERAL ADJUNTA MÉDICA
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGÍA.



DR. EDUARDO LICEAGA

Carta de consentimiento informado

Protocolo: PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS DIFERENTES PATRONES DE CONSUMO DE ALCOHOL Y EN ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA

Iniciales del paciente: _____

Fecha de lectura y llenado: _____

Se me ha invitado a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participo o no, debo conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado: se me garantiza que tengo absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que me ayude a aclarar mis dudas al respecto.

Una vez que yo haya comprendido el estudio y si deseo participar, entonces se me pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se me entregará una copia firmada y fechada.

1. Esta es una investigación con riesgo mínimo

2. FORMATO DE CONSENTIMIENTO

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Un gran número de características individuales (de cada persona) están relacionadas con el daño hepático (afección del hígado) por consumo de alcohol (tomar bebidas embriagantes). Es necesario conocer más a fondo como ocurre esto, para contribuir a desarrollar nuevos métodos diagnósticos e incluso nuevos tratamientos.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo: Estudiar la asociación entre la cantidad de alcohol que consume y su efecto en las células linfocitarias que son parte las defensas del cuerpo y en la producción de proteínas (elementos de la sangre) que favorecen el daño que produce el consumo de alcohol.

II. PROCEDIMIENTO DE ESTUDIOS

En caso de aceptar participar en el estudio, se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y antecedentes médicos. También se le realizará una extracción de 30mL de sangre que se le tomara del brazo, la cantidad de sangre que se tomará no produce ningún problema en su salud. La toma de sangre se hará por personal calificado, con material nuevo y estéril.

III. MOLESTIAS Y RIESGOS ESPERADOS:

Los riesgos de la toma de sangre, son que se pueda formar una equimosis o morete lo cual muy pocas veces sucede pero es importante que este informado de este riesgo.

Protocolo "Participación de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en los diferentes patrones de consumo de alcohol y en enfermedad hepática alcohólica" Investigador principal: Dr. José Luis Pérez Hernández, Teléfono: 2789-2000 ext. 1315 Dirección: Dr. Balmis 148 Col. Doctores Del. Cuauhtémoc C.P. 06726 México DF. Servicio de Gastroenterología Unidad 107 Presidenta comité de Ética: Dra. Estela García Elvira, Teléfono 2789-2000 ext. 1330 Página 1 de 3

IV. BENEFICIOS DEL ESTUDIO Y DE LA PARTICIPACIÓN

El beneficio directo para usted será conocer el estado de su hígado y las células que son de defensa a través de la realización de diversas pruebas de investigación, que serán gratuitas.

La información obtenida puede ayudar en un futuro a encontrar nuevos tratamientos para pacientes con la misma enfermedad que Usted padece. Los resultados de los estudios que se realicen a su sangre se le informarán por escrito a usted y a su médico tratante.

Este estudio no tendrá ningún costo para usted ni recibirá ningún pago por su participación.

V. Ud. recibirá los resultados e interpretación de los estudios de investigación y orientación en caso de detectarse algo. Sin embargo Ud. puede decidir no participar sin que esto afecte la atención que normalmente recibe en el Hospital General de México.

VI. ACEPTACIÓN PARA PARTICIPAR

Tendré la garantía de recibir respuesta a cada pregunta o aclaración a mis dudas acerca del proyecto de investigación que me están invitando a participar.

VII. Mi decisión de participar es completamente voluntaria, entendiendo que si decidiera no participar o retirarme del estudio, no necesito informar las razones de mi decisión a los investigadores, mismos que deberán respetarlas y sin que esto afecte la atención médica que se me brinda.

Los resultados serán totalmente confidenciales y se referirán al papel del estrés oxidativo, el perfil linfocitario en diferentes patrones de consumo de alcohol y en la enfermedad del hígado. Este es un estudio colaborativo entre investigadores del Hospital General de México y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

VIII y IX. AVISO DE CONFIDENCIALIDAD Y CONSENTIMIENTO PARA EL USO DE DATOS PERSONALES

El acceso a sus datos quedará restringido al investigador y sus colaboradores, así como al comité de Ética del Hospital General de México, siempre garantizando estricta confidencialidad, de acuerdo con la legislación y demás procedimientos aplicables.

Usted tiene derecho a acceder, rectificar, cancelar u oponerse al uso de sus datos personales, así como limitar el uso, divulgación o retirar el consentimiento en los términos establecidos por la Ley al domicilio del investigador citado anteriormente

El investigador mantiene las medidas de seguridad necesaria para proteger sus datos personales, contra daño, pérdida, alteración, destrucción o el uso o acceso no autorizado.

X y XI. Si tuviese preguntas al respecto, puedo comunicarme con el Dr. José Luis Pérez o la Dra. Gabriela Gutiérrez a los teléfonos 56-23-26-73 o al 56-23-26-84, laboratorio HIPAM Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM. Para cualquier duda puedo acudir con la Dra. Estela García Elvira, Presidenta de la Comisión de Ética, tel.: 2789-2000 ext. 1330. Teléfono disponible las 24 hrs: 56-05-92-18.

XII a XV. Página de firmas

Yo, (Iniciales) _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado(a) y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Firma del Paciente o Huella Digital

Testigo (Nombre y firma)

Dirección: _____

Parentesco: _____

Testigo (Nombre y firma)

Dirección: _____

Parentesco: _____

Fecha de llenado: _____

He explicado al Sr(a). (Iniciales) _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

Dr. José Luis Pérez o la Dra. Gabriela Gutiérrez a los teléfonos 20955973 o al 56-23-26-84, Servicio de Gastroenterología o Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM. Teléfono disponible las 24hrs: 56-05-92-18.

15.2 Anexo 2. Cuestionario AUDIT

Por favor coloca el número de la respuesta para cada pregunta en el recuadro.

<p>4. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <input type="text"/>	<p>9. ¿Usted o alguna otra persona ha resultado herido porque usted había bebido?</p> <p>(0) No (2) Sí, pero no en el curso del último año (4) Sí, el último año</p> <input type="text"/>
<p>5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <input type="text"/>	<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?</p> <p>(0) No (2) Sí, pero no en el curso del último año (4) Sí, el último año</p> <input type="text"/>
<p>1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?</p> <p>(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> <input type="text"/>	<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?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <input type="text"/>
<p>2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?</p> <p>(0) 1 o 2 (1) 3 o 4 (2) 5 o 6 (3) 7, 8, o 9 (3) 10 o más</p> <input type="text"/>	<p>7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <input type="text"/>
<p>3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <p><i>Pase a las preguntas 9 y 10 si la suma total de las preguntas 2 y 3 = 0</i></p> <input type="text"/>	<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?</p> <p>(0) Nunca (1) Menos de una vez al mes (2) Mensualmente (3) Semanalmente (4) A diario o casi a diario</p> <input type="text"/>

15.3 Anexo 3. Encuesta personalizada a cerca del consumo de alcohol.

Nombre: _____ Fecha: _____ No. _____

Edad _____ Sexo: _____ Edo. Civil: _____ Escolaridad: _____

Ocupación: _____ Fecha de nacimiento: _____ Originario: _____

Religion: _____ Direccion: _____

Telefono: _____ Email: _____

1. Mencine el lugar de donde son (eran) originarios sus:

Padres: _____ Abuelos: _____
Mama: _____ Papas de tus abuelos: _____
Papa: _____

2. ¿Algún familiar tuvo problemas con el alcohol? Si: _____ No: _____
¿Quién? _____

3. ¿Alguno de ellos habla (o hablaban) algun dialecto o lengua indígena?
Si: _____ No: _____ ¿Quien? _____ ¿Qué lengua o dialecto hablan? _____

Durante su infancia vivia en:

1. Vivienda propia
2. Vivienda rentada
3. Cuarto rentado
4. Sin direccion permanente
5. Pension o asilo
6. Otra

Actualmente vive en:

1. Vivienda propia
2. Vivienda rentada
3. Cuarto rentado
4. Sin direccion permanente
5. Pension o asilo
6. Otra

Ocupacion actual:

1. Estudiante Carrera: _____ Generacion: _____
2. Trabajador Empresa: _____ Puesto: _____
3. Estudiante y trabajador Carrera y generacion: _____ Empresa y puesto: _____
4. Otra especifique: _____

¿Esta siendo atendido por algun problema de salud en la actualidad? Si: _____ No: _____
¿Cual? _____

¿Ha sido hospitalizado? Si: _____ No: _____ ¿Cuántas veces?
¿Por qué motivo? _____

¿Actualmente toma un medicamento? (Incluyendo aspirina, vitaminas y anticonceptivos):

Si: _____ No: _____

En caso afirmativo, especifique:

Medicamento: _____ Dosis: _____ Tiempo de uso: _____
Motivo: _____

¿Ha consultado alguna vez a un psiquiatra o un psicologo? Si _____ No: _____

En caso afirmativo ¿A que edad fue la primera vez? _____ ¿Por qué motivo?: _____

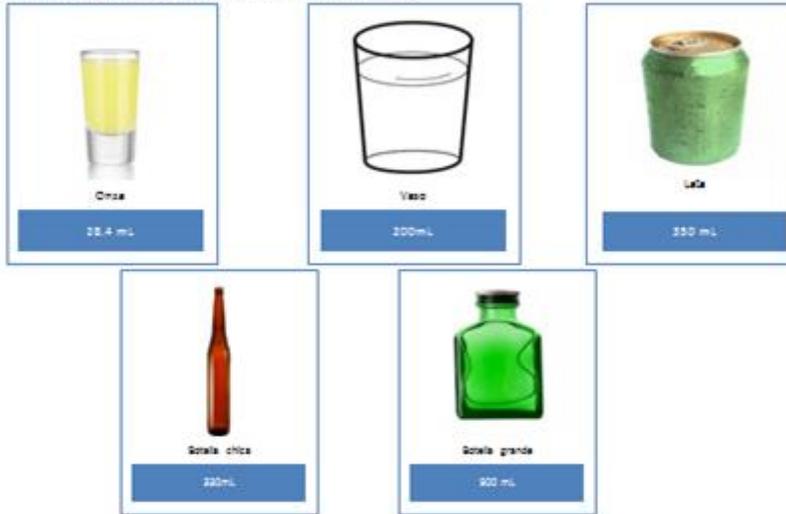
¿Ha consultado alguna vez a un psiquiatra o un psicólogo? Si ___ No: _____
 En caso afirmativo ¿A que edad fue la primera vez? _____ ¿Por qué motivo?: _____

¿Usted consume alcohol?: _____ Edad de inicio: _____

¿Qué tipo de es la que más consume?(Subraye su respuesta):

- 1)Tequila 2)Ron 3)Brandy 4)Whisky 5)Congnac 6)Vodka 7)Cerveza 8)Pulque 9)Alcohol etílico 10)Otro, especifique: _____

De estos ¿Cuál es la cantidad que toma en su copa?



No. Copas/día _____ Grde OH _____ ¿Cada cuando consume? _____ Fecha de ultimo consumo: _____

Marca TODAS las sustancias que has consumido (o probado):

Sutancia	Edad de inicio	Consumo habitual en el pasado Ejem: 16 copas cerveza/ día, 3 veces por semana	Consumo habitual actual Ejem: 8 copas de vino/día, 2 veces por semana
0. Ninguno			
1. Tabaco			
2. Alcohol			
3. Marihuana			
4. Cocaína			
5. Heroína			
6. Pastillas			
7. Otras:			

15.4 Anexo 4. Carta de aprobación del proyecto en el la Facultad de Medicina, UNAM y del Hospital General de México.



COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMEDI/CI/REGG/016/2018

ASUNTO: Dictamen de Proyecto FM/DI/135/2017

Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

Profesor Titular "A" T.C.
Unidad de Medicina Experimental
Presente.

Estimada Dra. Gutiérrez Reyes:

Me complace informarle que su proyecto **FM/DI/135/2017** de título "**Participación de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en los diferentes patrones de consumo de alcohol y en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica**" ha sido revisado y **APROBADO** por las Comisiones de Investigación y de Ética en sesión ordinaria de fecha 06 de febrero de 2018, con una vigencia de 3 años a partir de la fecha de la sesión.

Deberá ejecutar el proyecto de acuerdo a lo especificado en el protocolo, tanto en los aspectos metodológicos como en los aspectos éticos y notificar cualquier modificación o enmienda al mismo. Por otro lado para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual en la División de Investigación de esta Facultad, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen. Asimismo le solicitamos nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de febrero de 2018.

LA SECRETARIA TÉCNICA



DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

*REGG/ETF.

Comité de Investigación de la Facultad de Medicina-UNAM, con fecha 01 de Junio de 2015, se expide Registro COFEPRIS Número: 15 CI 09 003 021



2016, Año del Nuevo Sistema de Justicia Penal

Of. No. DI/03/16/150

Ciudad de México a 22 de marzo de 2016

DR. JOSÉ LUIS PÉREZ HERNÁNDEZ

Servicio de Gastroenterología

Presente

Estimado Dr. Pérez:

Por este conducto hago de su conocimiento que la última versión del protocolo titulado: "PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS DIFERENTES PATRONES DE CONSUMO DE ALCOHOL Y ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA", con clave de registro DI/16/107/03/031, así como el Consentimiento Informado, fueron presentados a los Comités de Ética en Investigación y Comité de Investigación, quienes dictaminaron su **APROBACIÓN**. Por lo tanto, puede dar inicio a su investigación.

"A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"
Atentamente

DR. GUILLERMO BELÉNDEZ MIER

Encargado de los Asuntos del Despacho de
la Dirección de Investigación

GMM/ndg*



DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN
www.hg.mex.mx

Dr. Belén 108
Calle de Progreso
Tlalpacan Cuauhtémoc
México DF 06750

Tel: 55 53 13 01 8947
Cee: +52 552 2892100
Ext: 364

15.5 Anexo 5. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4ª Edición (DSM-IV).

Conteste las siguientes preguntas, respondiendo SI o No según sea el caso, en este último año

1. ¿Considera que cada ocasión que toma necesita ingerir mayor cantidad de copas para sentirse bajo los efectos del alcohol?
2. Después de un tiempo de dejar o reducir el consumo prolongado en grandes cantidades de alcohol, ¿ha notado que tiene algunos de los siguientes síntomas?

<i>Signo / Síntoma</i>	<i>Si</i>	<i>No</i>
<i>Sudoración</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Temblor distal de las manos</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Insomnio</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Náuseas o vómitos</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Alucinaciones visuales, táctiles o auditivas transitorias o ilusiones</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Agitación</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Ansiedad</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Crisis epilépticas</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. ¿Considera que sus periodos de consumo se han ido alargando en cantidad y tiempo?
4. ¿Ha notado que una vez que empieza a tomar ya no puede parar?
5. ¿Ha dejado de realizar sus actividades cotidianas por consumir alcohol?
6. ¿Consume alcohol a pesar de haber tenido un problema físico o psicológico persistente u ocurrente?

En el último año:

1. ¿El consumo de alcohol le ha impedido realizar sus actividades cotidianas?
2. ¿Por consumir alcohol ha puesto en peligro su integridad física?
3. ¿Ha tenido problemas legales recurrentes por haber consumido alcohol?
4. ¿Ha tenido conflictos personales con familiares, amigos o vecinos a consecuencia del alcohol?

¿Cumple criterios de abuso según el DSM-IV?

Si: _____ No: _____

¿Cumple criterios de dependencia según el DSM-IV?

Si: _____ No: _____