

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/16
I.S.B.N.: 978-84-15910-11-4

JOSÉ ALEJANDRO MEDINA GARCÍA

**Cambios en el perfil de citoquinas y mortalidad
en el alcohólico: un estudio secuencial**

Directores

**CARLOS EMILIO GONZÁLEZ REIMERS
MARÍA DEL CARMEN DURÁN CASTELLÓN
PEDRO ABREU GONZÁLEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos:

Es de obligada justicia citar aquí primero a mi director y tutor, el Profesor González Reimers, por más motivos de los que cabría en un apartado así, pero destacando su paciencia, erudición y su guía, sin la que no hubiera considerado iniciar este trabajo siquiera. Agradecimiento también a mis co-tutores, la Doctora Durán Castellón y el Doctor Pedro Abreu González, por sus consejos y sus ideas. Al Doctor José María González Pérez y María José Monedero Prieto, por tantas horas y preocupaciones comunes. Al Profesor Tomás González, por su paciencia y ayuda. A Nacho, Mingo y Javi, por los mismos motivos.

Gracias a mi familia, que ha esperado ver la conclusión de este trabajo con amor y paciencia, especialmente a mi padre, el Profesor Eduardo Medina de la Rosa, quien comenzó toda la historia con el trabajo “Equilibrios en disolución acuosa entre el Fe(II), el Fe(III) y los ácidos carboximetil-N-aspartico y dicarboximetil-N,N-metionina”, mostrándome el camino, y para quien este trabajo está especialmente dedicado.

Y por supuesto a Paloma, que ha tenido una fe irracional en mí desde que empezó esta empresa, por su dedicación, paciencia y amor.

“Algo termina, algo comienza”

- *Andrzej Sapkowski*

“Sapere aude! Habe Mut, dich, deines eigenes Verstandes zu bedienen!”

- *Immanuel Kant*

Índice

Tesis doctoral.....	1
Índice	3
Tabla de Ilustraciones y figuras	8
Capítulo I.....	8
Capítulo III.....	9
Capítulo IV.....	9
Listado de abreviaturas y fórmulas químicas:.....	16
I. Introducción	25
Fisiopatología de la lesión hepática mediada por alcohol.....	27
Metabolismo del etanol.....	28
Etanol e inflamación:.....	30
Citocinas. Generalidades.....	40
TNF- α	41
Il-6.....	46
.....	48
Il-8.....	49
IFN- γ	52
IL-12.....	54
IL-4.....	55

IL-10.....	57
IL-13.....	57
Tolerancia al LPS:	60
Estrés oxidativo y peroxidación lipídica.....	62
Efectos de las ROS:	63
Mecanismos de defensa ante ROS:.....	65
Etanol y peroxidación lipídica.	67
.....	67
.....	67
Patogenia de la hepatopatía alcohólica.....	68
II. Objetivos	79
III. Material y Métodos	81
1. Grupo de estudio.....	82
2. Extracción de muestras. Variables estudiadas.	82
3. Análisis estadístico	89
IV. Resultados	91
1. Diferencias en cuanto a niveles de MDA y de citoquinas en el momento inicial.	

Diferencias en cuanto a niveles de MDA y citoquinas en cirróticos, no cirróticos y controles en el momento inicial.....	92
MDA:.....	92
Citoquinas proinflamatorias:.....	93
Citoquinas antiinflamatorias:	95
2. Citoquinas y función hepática en el momento inicial.	97
2.1. Relación entre los niveles de MDA y citoquinas y la función hepática en todos los pacientes en el momento inicial.....	97
2.2. Relación entre los niveles de MDA y de citoquinas y las variables de función hepática en pacientes cirróticos en el momento inicial.	110
2.3. Relación entre los niveles de MDA y de citoquinas y las variables de función hepática en pacientes no cirróticos en el momento inicial.	119
3. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial.	126
3.1. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial en pacientes cirróticos y no cirróticos.	126
3.2. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial en pacientes cirróticos.	128
3.3. Estado nutricional y niveles de MDA y citoquinas en el momento inicial en pacientes no cirróticos.	129
4. Niveles de MDA y citoquinas en el momento inicial y consumo de alcohol.	130
4.1. Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes cirróticos y no cirróticos en el momento inicial.	130

4.2 Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes cirróticos en el momento inicial.....	132
4.3. Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes no cirróticos en el momento inicial.....	134
5. Mortalidad inicial y niveles iniciales de MDA y de citoquinas.....	135
Mortalidad:.....	135
5.1. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas con la mortalidad en todos los pacientes (cirróticos y no cirróticos).	135
5.2. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas con la mortalidad en los pacientes cirróticos.	140
5.3. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas y mortalidad en pacientes no cirróticos.....	146
6. Evolución de los niveles de MDA y citoquinas a los seis meses.	147
7. Evolución de los valores de MDA y de las citoquinas con respecto a la abstinencia.....	153
7.1. Evolución de los valores de MDA y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando todos los pacientes (cirróticos y no cirróticos).	153
7.2. Evolución de los valores de MDA y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando los pacientes cirróticos.....	159

7.3. Evolución de los valores de MALD y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando los pacientes no cirróticos.....	162
8. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas y la mortalidad.	167
8.1. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando todos pacientes (cirróticos y no cirróticos).....	167
8.2. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando los pacientes cirróticos.	172
8.3. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando los pacientes no cirróticos.	174
9 Análisis de regresión de Cox de la mortalidad.....	175
V. Discusión	178
Citoquinas y consumo de alcohol:	179
Evolución de las citoquinas en el tiempo.	189
Mortalidad	193
VI. Conclusiones.....	195
Bibliografía.....	198

Tabla de Ilustraciones y figuras

Capítulo I.

Figura I I.1: Oxidación de etanol (A) y oxidación de acetaldehído (B)	28
Figura I I.2 Disrupción de las TJ y AJ debido a etanol y acetaldehído	33

Figura I I.3 Interacción TLR4-MD2-LPS	36
Figura I I.4 Señalización intracelular tras interacción LPS-TLR4 y/o LPS-TLR1/6-TLR-2 .	39
Figura I I.5 Estructura esquemática del TNF, sus receptores y sus interacciones.....	42
Figura I I.6 Señalización canónica de IL-6	47
Figura I I.7 Señalización “trans” de IL-6 a través de sIL-6R.....	48
Figura I I.8 Vías de Señalización de IL-8.....	52
Figura I I.9 Efectos de IL-13.....	59
Figura I I.10 . ROS. Detoxificación mediante GSH	66
Figura I I.11 Reacción de Fenton	67
Figura I I.12 Reacción de Haber-Weiss	67
Figura I I.13 Metabolismo de la metionina. Trans-sulfuración para generar GSH.....	71

Capítulo III.

Tabla III. 1 Puntuación Child-Pugh.....	86
Tabla III. 2 Clasificación de Child-Pugh	86
Figura III. 1 Grupo de Estudio	82
Figura III. 2 Cálculo de gramos de alcohol.....	88

Capítulo IV.

Tabla IV.1 Niveles de MDA	92
Tabla IV.2 MDA en pacientes y controles.....	93

Tabla IV.3 Citoquinas proinflamatorias	94
Tabla IV.4 Citoquinas antiinflamatorias	96
Tabla IV.5 Niveles de IL-13.....	96
Tabla IV.6 TNF y función hepática (todos los pacientes).....	97
Tabla IV.7 TNF y niveles de LDH y Ferritina (todos los pacientes)	99
Tabla IV.8 Niveles de IL-6 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)	99
Tabla IV.9 Niveles de IL-8 y Albúmina, GOT y GPT (todos los pacientes).....	100
Tabla IV.10 Niveles de IL-8 e IgG (todos los pacientes).....	101
Tabla IV.11 Niveles de IFN y GOT y GPT (todos los pacientes).....	102
Tabla IV.12 Receptores solubles de TNF y Albúmina (todos los pacientes).....	102
Tabla IV.13 Niveles de IL-4 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)	104
Tabla IV.14 Niveles de IL-4 y de GOT y FA (todos los pacientes).....	105
Tabla IV.15 Niveles de IL-4 y de IgG e IgA (todos los pacientes)	105
Tabla IV.16 Niveles de IL-10 y de Albúmina y Bilirrubina (todos los pacientes)	106
Tabla IV.17 Niveles de IL-10 y de IgG, IgA e IgM (todos los pacientes).....	107
Tabla IV.18 Niveles de IL-13 y de Albúmina (todos los pacientes)	108
Tabla IV.19 Niveles de TNF y de LDH y FA (cirróticos).....	110
Tabla IV.20 Niveles de TNF y de IgM (cirróticos).....	111
Tabla IV.21 Niveles de IL-8 y de GOT, GPT y LDH (cirróticos).....	112
Tabla IV.22 Niveles de IL-8 y de IgA (cirróticos)	112
Tabla IV.23 Niveles de IFN y de Bilirrubina (cirróticos)	113
Tabla IV.24 Niveles de TNFRS60s y TNFRS80s y Albúmina (cirróticos)	115
Tabla IV.25 Niveles de IL-4 y de Albúmina (cirróticos)	117
Tabla IV.26 Niveles de IL-4 y de GOT y FA (cirróticos).....	118

Tabla IV.27 Niveles de IL-10 y de IgM (cirróticos)	118
Tabla IV.28 Niveles de IL-13 y de GPT y FA (cirróticos)	118
Tabla IV.29 Niveles de MDA y de GOT, GPT y LDH (no cirróticos)	119
Tabla IV.30 Niveles de TNF y función hepática (no cirróticos).....	119
Tabla IV.31 Niveles de IL-6 y Plaquetas (no cirróticos).....	120
Tabla IV.32 Niveles de IL-8 y función hepática (no cirróticos)	121
Tabla IV.33 Niveles de IL-8 y Plaquetas (no cirróticos).....	122
Tabla IV.34 Niveles de TNFRS60s y de Albúmina y FA (no cirróticos)	123
Tabla IV.35 Niveles de TNFRS80s y de Albúmina (no cirróticos).....	123
Tabla IV.36 Niveles de IL-4 y Albúmina (no cirróticos).....	124
Tabla IV.37 Niveles de IFN y VNS (todos los pacientes)	126
Tabla IV.38 Niveles de IFN y VNS (cirróticos)	128
Tabla IV.39 Mortalidad	135
Tabla IV.40 Supervivencia e IL-6.....	136
Tabla IV.41 Supervivencia e IL-8 (cuartiles, todos los pacientes).....	137
Tabla IV.42 Supervivencia e IL-4 (cuartiles, todos los pacientes).....	138
Tabla IV.43 Supervivencia e IL-4 (terciles, todos los pacientes).....	139
Tabla IV.44 Supervivencia y TNF (cuartiles, sólo cirróticos)	141
Tabla IV.45 Supervivencia e IL-8 (Q1 frente a Q4, sólo cirróticos).....	142
Tabla IV.46 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (Q 1 frente a Q4, sólo cirróticos)	142
Tabla IV.47 Supervivencia e IL-8 (cuartil 4, sólo cirróticos).....	142
Tabla IV.48 Supervivencia e IL-10 (terciles, sólo cirróticos)	144

Tabla IV.49 Supervivencia e IL-13 (Q1-Q4, sólo cirróticos)	145
Tabla IV.50 Niveles de MDA a los 6 meses	147
Tabla IV.51 Niveles de IL-8 a los 6 meses	149
Tabla IV.52 Contraste multivariado: MDA-Abstinencia	153
Tabla IV.53 Interacción entre abstinencia y cambio en los niveles de MDA	154
Tabla IV.54 Supervivencia y cambio en niveles de MDA.....	167
Tabla IV.55 Supervivencia y cambio en niveles de TNF.....	168
Tabla IV.56 Supervivencia y cambio en niveles de IL-6	169
Tabla IV.57 Supervivencia y cambio en los niveles de IFN	170
Tabla IV.58 Supervivencia y cambio en los niveles de IFN	172
Tabla IV.59 Pruebas omnibus	175
Tabla IV.60 Variables en la ecuación (pasos 1-3)	176
Tabla IV.61 Variables en la ecuación (pasos 4-8)	177
Gráfico IV-1 Niveles de MDA	92
Gráfico IV-2 Niveles basales de TNF, IL-6, IFN, TNFRS60s y TNFRS80s	94
Gráfico IV-3 Niveles basales de IL-8.....	95
Gráfico IV-4 TNF y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)	97
Gráfico IV-5 TNF y Bilirrubina (todos los pacientes).....	98
Gráfico IV-6 TNF y Albúmina (todos los pacientes)	98
Gráfico IV-7 IL-6 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)	100
Gráfico IV-8 IL-8 y Albúmina (todos los pacientes)	101
Gráfico IV-9 TNFRS60s y Albúmina (todos los pacientes)	103
Gráfico IV-10 TNFRS80s y Albúmina (todos los pacientes)	103

Gráfico IV-11 Niveles de IL-4 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes).....	104
Gráfico IV-12 IL-10 y Albúmina (todos los pacientes)	106
Gráfico IV-13 IL-10 y Bilirrubina (todos los pacientes)	107
Gráfico IV-14 IL-13 y Albúmina (todos los pacientes)	108
Gráfico IV-15 Niveles de IL-13 y de IgA (todos los pacientes)	109
Gráfico IV-16 TNF y Encefalopatía hepática (cirróticos).....	110
Gráfico IV-17 IL-8 y Escala de Child-Pugh (cirróticos).....	111
Gráfico IV-18 IFN y Escala de Child-Pugh (cirróticos)	113
Gráfico IV-19 IFN y Bilirrubina (cirróticos).....	114
Gráfico IV-20 Niveles de IFN y de IgA (cirróticos).....	114
Gráfico IV-21 TNFRS60s y Albúmina (cirróticos)	115
Gráfico IV-22 TNFRS80s y Albúmina (cirróticos)	116
Gráfico IV-23 IL-4 y Albúmina (cirróticos)	117
Gráfico IV-24 TNF y Actividad de la protrombina (no cirróticos)	120
Gráfico IV-25 IL-8 y Albúmina (no cirróticos)	121
Gráfico IV-26 IL-8 y Actividad de la protrombina (no cirróticos)	122
Gráfico IV-27 TNFRS60s y Albúmina (no cirróticos)	123
Gráfico IV-28 TNFRS80s y Albúmina (no cirróticos)	124
Gráfico IV-29 IL-4 y Albúmina (no cirróticos)	125
Gráfico IV-30 IFN y VNS (todos los pacientes).....	126
Gráfico IV-31 IFN y Categoría Nutricional (todos los pacientes).....	127
Gráfico IV-32 IL-13 y Categoría Nutricional (todos los pacientes)	128

Gráfico IV-33 IFN y VNS (cirróticos).....	129
Gráfico IV-34 TNF y tiempo de consumo (todos los pacientes)	130
Gráfico IV-35 IL-10 y consumo diario (todos los pacientes).....	131
Gráfico IV-36 IL-13 y consumo diario (todos los pacientes).....	132
Gráfico IV-37 TNFRS60s y consumo diario (cirróticos).....	133
Gráfico IV-38 TNFRS80s y consumo diario (cirróticos).....	133
Gráfico IV-39 IL-13 y consumo diario (no cirróticos).....	134
Gráfico IV-40 Curva de Kaplan-Meier para IL-6 (cuartiles, todos los pacientes)	136
Gráfico IV-41 Curva de Kaplan-Meier para IL-6 (mediana, todos los pacientes)	137
Gráfico IV-42 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (cuartiles, todos los pacientes)	138
Gráfico IV-43 Curva de Kaplan-Meier para IL-4 (cuartiles, todos los pacientes)	139
Gráfico IV-44 Curva de Kaplan-Meier para IL-4 (terciles, todos los pacientes)	140
Gráfico IV-45 Curva de Kaplan-Meier para TNF (cuartiles, sólo cirróticos)	141
Gráfico IV-46 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (cuartil 4, sólo cirróticos).....	143
Gráfico IV-47 Curva de Kaplan-Meier para IL-10 (terciles, sólo cirróticos).....	144
Gráfico IV-48 Curva de Kaplan-Meier para IL-13 (cuartiles, sólo cirróticos).....	145
Gráfico IV-49 Niveles de MDA a los 6 meses.....	148
Gráfico IV-50 Niveles de IL-8 a los 6 meses	150
Gráfico IV-51 Niveles de IFN a los 6 meses	151
Gráfico IV-52 Niveles de IL-13 a los 6 meses	152
Gráfico IV-53 Cambio en niveles de MDA según abstinencia	154
Gráfico IV-54 Cambio en los niveles de IL-6 según abstinencia	155
Gráfico IV-55 Cambio en los niveles de IL-8 según Abstinencia.....	156
Gráfico IV-56 Cambio en los niveles de IL-4 según Abstinencia.....	158

Gráfico IV-57 Cambio en los niveles de MDA según abstinencia	159
Gráfico IV-58 Cambio en los niveles de TNF según Abstinencia	160
Gráfico IV-59 Cambio en los niveles de IL-6 según Abstinencia.....	163
Gráfico IV-60 Evolución de los niveles de IL-8 según Abstinencia	164
Gráfico IV-61 Cambio en los niveles de IL-4 según Abstinencia.....	166
Gráfico IV-62 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en niveles de MDA.....	168
Gráfico IV-63 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de TNF	169
Gráfico IV-64 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en niveles de IL-6.....	170
Gráfico IV-65 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de IFN.....	171
Gráfico IV-66 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de IFN.....	173

Listado de abreviaturas y fórmulas químicas:

•OH.....	Radical hidroxilo
4-HNE.....	4-hidroxi-nonenal
ADH.....	Alcohol deshidrogenasa
AJ.....	<i>Adherens Junctions</i> , Uniones Adherentes
ALDH.....	Aldehído-deshidrogenasa
AP-1.....	<i>Adaptor Protein Complex 1</i> , complejo proteico de adaptación-1
ATP.....	Trifosfato de adenosina
CLR.....	<i>C-lectine type receptors</i> , Receptores tipo lectina-C
CMH.....	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMH-I.....	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I
CMH-II.....	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II
CO ₂	dióxido de carbono
CYP2E1.....	Citocromo P450 2 (familia) E (subfamilia) 1 (gen)
DAMP.....	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i> , patrones moleculares asociados a peligro
EGFR.....	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico.

FA.....Fosfatasa alcalina

FADD.....*FAS-Associated Death Domain*, dominio de muerte asociada a FAS.

GGT.....Gamma-glutamyl-transpeptidasa

GOT.....Transaminasa glutámico-oxalacético.

gp130.....Glicoproteína 130

GPT.....Transaminasa glutámico-pirúvico.

GPX.....Glutación-peroxidasa

GSH.....Glutación reducido

GTP.....Trifosfato de guanidina

H₂O.....Agua

H₂O₂.....Peróxido de hidrógeno

H₃PO₄.....Ácido fosfórico

ICAM-1.....*Intercellular adhesion molecule*, molécula de adhesión intercelular.

IFN-R.....Receptor de interferón

IFN-β.....Interferón-β

IFN- α	Interferón- α
IFN- γ	Interferón- γ
IKK- β	Kinasa β de IK.
IL-1.....	Interleuquina 1
IL-10.....	Interleuquina 10
IL-10R1.....	Receptor tipo 1 de IL-10
IL-10R2.....	Receptor tipo 2 de IL-10
IL-12.....	Interleuquina 12
IL-12p40.....	Subunidad 40S de IL-12
IL-12p70.....	Subunidad 70S de IL-12
IL-12R β 1.....	Receptor β -1 de IL-12
IL-12R β 2.....	Receptor β -2 de IL-12
IL-13.....	Interleuquina 13
IL-13R- α 1.....	Receptor α -1 de IL-13
IL-13R- α 2.....	Receptor α -2 de IL-13
IL-23.....	Interleuquina 23
IL-27.....	Interleuquina 27
IL-4.....	Interleuquina 4

IL4R- αReceptor α de IL-4

IL-6.....Interleuquina 6

IL-6R.....Receptor de IL-6

IL-6Rs.....Receptor soluble de IL-6

IL-8.....Interleuquina 8

IMC.....Índice de masa corporal

IRAK-1.....*Interleukin Receptor-Associated Kinase*, kinasa asociada al receptor de interleuquina (1).

IRAK-2.....*Interleukin Receptor-Associated Kinase*, kinasa asociada al receptor de interleuquina (2).

IRAK-4.....*Interleukin Receptor-Associated Kinase*, kinasa asociada al receptor de interleuquina (4).

IRF.....*Interferon regulatory factor*, factor regulador de interferon.

JAK.....*Janus kinase*, kinasa "Janus".

LDH.....Lactato deshidrogenasa

LPS.....Lipopolisacárido

LRR.....*Leucin-rich receptor*, receptor rico en leucina

MAP.....*Mitogen activated protein*, proteína activada por mitógenos.

MDA.....Malondialdehído

memTNF.....TNF anclado a la membrana plasmática

MEOS.....*Microsomal Ethanol-Oxidizing System*, sistema microsomal de oxidación del etanol.

MMP.....*Matrix metalloprotease*, metaloproteasa de matriz.

Mn.....Manganeso

Na⁺..... Cation Sodio

NAD.....Dinucleótido de nicotina-adenina

NADH.....Dinucleótido de nicotina-adenina (reducido)

NADP.....Dinucleótido de nicotina-adenina fosfato

NADPH.....Dinucleótido de nicotina-adenina fosfato(reducido)

NEMO.*NFκβ essential modulator*, modulador esencial de NFκβ

NF- κβ.....*Nuclear Factor κβ*, factor nuclear κβ

NK.....*Células Natural Killer*

NKT.....*Natural Killer T-cells*, células T NK

NLR.....*NOD-like receptors*, receptores tipo NOD

NO.....Óxido nítrico

NOD. *Nucleotide Oligomerization Domain*, dominio de oligomerización de nucleótidos

O_2^-Anión superóxido

$OONO^-$Radical peroxinitrito

PAMP.....*Pathogen associated molecular patterns*,
patrones moleculares asociados a patógenos

PARP.....*Poly ADP (Adenosine Diphosphate)-
Ribose Polymerase*, poli-ADP-ribosa polimerasa.

PM.....Peso molecular.

PPAR- α*Peroxisome Proliferator Activated
Receptor*, receptor del activador de proliferador de peroxisomas.

PRR.....*Pattern Recognition Receptor*, receptor
de reconocimiento de patrones.

Q_xCuartil X

RIP.....*Receptor-Interacting Protein*,
proteína de interacción con el receptor

RLR.....*Retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*,
receptores tipo gen inducible I del ácido retinoico

ROOH.....Hidroperóxido orgánico

ROS.....*Reactive-oxygen species*, especies reactivas de oxígeno.

SARM.....*Sterile A and HEAT (Hydroxyphenyl-Ethyl-Aminomethyl-Tetralone)-Armadillo Motifs*, proteínas (A y HEAT) estériles con motivos de armadillo

Se.....Selenio

SOCS.....*Suppressor Of Cytokine Signaling*,
supresor de señalización de citoquinas.

SOD.....Superóxido dismutasa.

STAT.....*Signal Transducer and Activator of Transcription*, transductor y activador de señal.

sTNF.....TNF soluble

TAB.....*TAK1 binding protein*,
proteína fijadora de TAK1.

TACE.....*Tumoral necrosis factor converting enzyme*,
enzima convertidora del TNF.

TAK-1.....*TGF- β associated kinase 1*,
kinasa1 activada por TGF- β

TBA.....*Thiobarbituric acid*, ácido tiobarbitúrico

TBARS.....*Thiobarbituric acid reacting substance*,
sustancia reactiva al TBA.

TICAM-1.Véase TRIF

TIR.....*Toll-Interleukin 1 Receptor*,
receptor peaje de interleuquina 1.

TJ.....*Tight Junction*, unión estrecha.

TLR.....*Toll-like receptor*, receptor tipo peaje.

TNF.....*Tumoral necrosis factor*, factor de necrosis tumoral

TNFR-1.....*Tumoral necrosis factor receptor 1*,
receptor 1 del TNF

TNFR-2*Tumoral necrosis factor receptor 2*,
receptor 2 del TNF

TNFR-55.....TNFR-1

TNFR-60.....TNFR-2

TNFR-75.....TNFR-1

TNFR-80.....TNFR-2

TNFrs60.....TNFR-1

TNFRs80.....	TNFR-2
TRADD.....	<i>TNF receptor-associated death domain</i> , dominio de muerte asociado al receptor del TNF
TRAF.....	<i>TNF receptor associated factor</i> , factor asociado al receptor del TNF
TRAM.....	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> , molécula adaptadora relacionada con TRIF
TRAP.....	<i>TNF receptor associated protein</i> , proteína asociada al receptor del TNF
TRIF.....	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i> adaptador inductor de IFN- β que contiene dominio TIR
VCAM-1.....	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> , molécula de adhesión de células vasculares
VEGFR.....	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> , receptor del factor de crecimiento vascular endothelial.
VCM.....	Volumen corpuscular medio
VHC.....	Virus de la Hepatitis C
Zn.....	Zinc
ZO.....	<i>Zonula occludens</i>

Capítulo I

I. Introducción

Las bebidas alcohólicas como el vino (Juan Carlos I, 2003) y la cerveza son consideradas hoy en día como alimentos por los estamentos oficiales de la sociedad. Sin embargo, el alcohol, desde un punto de vista médico es una droga de abuso, cuyo consumo prolongado produce enfermedad multisistémica, tolerancia y dependencia y cuya retirada brusca puede desencadenar un síndrome de abstinencia que no está exento de mortalidad (Secades et al, 2010). Desde un punto de vista orgánico el alcohol produce enfermedades clínicamente bien documentadas. El espectro del daño orgánico generado por el consumo de alcohol es de dimensiones sistémicas, con efectos deletéreos en el hueso, cerebro, nervio periférico, músculo estriado (esquelético y cardíaco), gónadas, tracto digestivo, páncreas o hígado por citar algunos ejemplos. Es sin embargo en el hígado donde más se han estudiado los efectos perjudiciales del alcohol. La hepatopatía alcohólica comprende un abanico de entidades relacionadas de forma compleja entre sí y que van desde enfermedades descritas por los antiguos, como es la cirrosis hepática, hasta entidades descritas de forma más reciente, como es la hepatitis aguda alcohólica. La interrelación entre las diversas formas que componen el complejo clínico de la hepatopatía alcohólica es objeto actual de numerosos estudios.

Cabe destacar que las distintas entidades (esteatosis alcohólica, hepatitis alcohólica aguda, fibrosis hepática alcohólica, cirrosis hepática alcohólica y carcinoma hepatocelular) pueden coexistir en un mismo individuo sin marcar necesariamente un estadio evolutivo de transición de una a otra entidad, de forma que no es excepcional que en el paciente cirrótico se presenten episodios reiterados de hepatitis aguda alcohólica, por ejemplo (O'Shea et al, 2010).

En la génesis de la hepatopatía alcohólica el sistema inmune tiene un papel preponderante. Es bien sabido que los pacientes alcohólicos están predispuestos a padecer infecciones (Adams et al, 1984), lo que sugiere una tendencia a la inmunosupresión. Sin embargo, buena parte de los daños puramente hepáticos motivados por el alcohol, como es el caso de la hepatitis alcohólica, obedecen a una actividad netamente proinflamatoria sobre el hígado (Lucey, 2009). En el desarrollo de la cirrosis hepática, por el contrario, parecen influir mecanismos más relacionados con la fibrosis-cicatrización que con un ambiente claramente proinflamatorio (Crews et al, 2006), aún cuando sean también las citoquinas proinflamatorias las últimas responsables de la fibrogénesis.

El riesgo de desarrollar daño hepático producido por alcohol guarda una relación no exactamente lineal con la cantidad de alcohol ingerida, pero en la evolución influyen múltiples factores, como pueden ser la edad, el sexo, la existencia en paralelo de esteatohepatitis no alcohólica o la infección por VHC, entre otros.

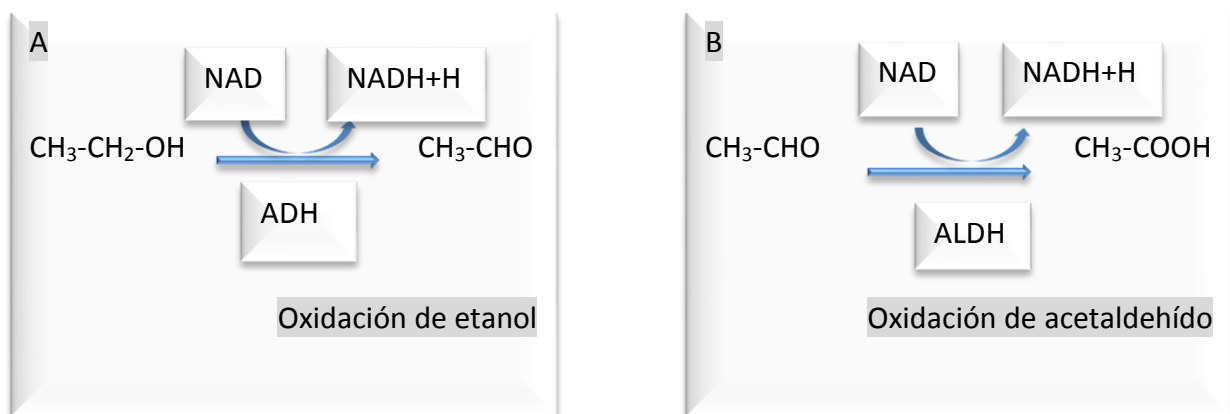
Fisiopatología de la lesión hepática mediada por alcohol.

Las teorías que intentan explicar cómo el alcohol daña el hígado son fundamentalmente dos. Por un lado está el daño producido de forma directa por el alcohol o derivado de su procesamiento por el organismo (teoría metabólica) y por otro están las complejas implicaciones que tiene el consumo de alcohol (crónico o en picos de consumo) sobre el sistema inmune (teoría inmunológica).

Metabolismo del etanol.

El etanol ingerido es objeto de una serie de reacciones de oxidación que conducen a su degradación final en H₂O y CO₂. El primer paso es la oxidación de etanol a acetaldehído por parte de la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH). Dicha enzima está presente en el estómago (aunque su actividad es muy reducida en la mujer) y en el citosol del hepatocito. Esta primera reacción de oxidación transcurre utilizando como cofactor al dinucleótido de nicotinamida (NAD). Además de en el citosol, la transformación en acetaldehído puede ocurrir de forma inducible en el sistema oxidativo microsomal del retículo endoplásmico (MEOS, de *microsomal ethanol oxidating system*), a través del citocromo CYP2E1. En ambos casos el producto, como ya se ha dicho, es acetaldehído, que es a su vez oxidado en la mitocondria, de nuevo en presencia de NAD, hasta acetato, mediante la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH). El acetato finalmente es oxidado a H₂O y CO₂ en los tejidos periféricos.

Figura I.1: Oxidación de etanol (A) y oxidación de acetaldehído (B)



Estas reacciones tienen consecuencias deletéreas para el organismo, no sólo por los productos generados (sobre todo en el caso del acetaldehído, como se verá más adelante) sino por el desequilibrio que suponen en el ambiente redox celular. Así

el consumo de NAD y la acumulación de su metabolito reducido, NADH, depleciona el potencial oxidante celular, lo que redundará, entre otras cosas, en una menor capacidad de oxidación de los ácidos grasos, con la consiguiente acumulación de triglicéridos en el hígado. Esto se ha señalado como paso importante para la génesis de la esteatohepatitis. En este sentido también conviene mencionar el efecto del etanol sobre moléculas como el receptor activado por proliferadores peroxisómicos α (PPAR- α), reduciendo sus niveles y aumentando así la acumulación de ácidos grasos (Lieber, 2004).

Por otra parte, la inducción enzimática del MEOS, en concreto de CYP2E1, el agotamiento de factores antioxidantes como el glutatión reducido, la alteración del metabolismo férrico hepático o de la cadena electrónica mitocondrial generan en el hepatocito un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). La célula de Kupffer, activada por medio de sus receptores tipo peaje (*toll-like receptors*, TLR) por gérmenes intestinales, y la célula de Ito (célula estrellada), activada por citoquinas derivadas de la célula de Kupffer, generan también un exceso de ROS, lo que retroalimenta su activación y su contribución al daño tisular. El estrés oxidativo daña macromoléculas cruciales como el DNA y las proteínas, alterando su plegamiento y produciendo en última instancia muerte celular, hecho reseñado ya hace dos décadas (Cederbaum, 1991).

Aparte de estos hechos incuestionables, consagrados por una investigación sólida que ha permitido la elaboración de teorías coherentes, cada vez se da mayor importancia al papel de las citocinas en la patogenia de esta enfermedad. Por eso, y

dado que el principal objetivo del presente trabajo es analizar su comportamiento secuencial en esta entidad, nos detendremos un poco más en la exposición de los conocimientos actuales al respecto.

Etanol e inflamación:

El consumo crónico de etanol favorece el paso de gérmenes gramnegativos desde la luz intestinal hasta la microcirculación hepática. Allí el lipopolisacárido (LPS) de la membrana de estos microorganismos estimula a la célula de Kupffer, de estirpe macrofágica (Parlesak et al, 2000) en presencia de receptores para el reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PAMP), en concreto TLR-4, interacción que veremos con más detalle a continuación. Dicho estímulo desencadena en la célula de Kupffer la producción de citocinas proinflamatorias, como son la IL-1, el TNF- α , la IL-6 o la quimiocina IL-8. El resultado neto es una mayor activación de las células de estirpe macrofágica y el quimiotactismo de otras células efectoras del sistema inmune innato, en concreto, neutrófilos, cuya degranulación junto con la acción directa del macrófago inicia el daño tisular que caracteriza las fases iniciales de la hepatopatía alcohólica. Pasamos a ver con más detalle los distintos elementos que intervienen en la activación de la célula de Kupffer merced a su interacción con el LPS.

Aumento de la cantidad de LPS que pasa a la circulación portal.

Está demostrado que el consumo de alcohol aumenta la cantidad de LPS que llega a la célula de Kupffer, que tiene lugar tanto con el consumo crónico como con cantidades puntuales (Rao, 2009). Para explicar este fenómeno se han postulado tres mecanismos diferentes y se ha demostrado que todos ellos influyen en mayor o menor

medida. Estos son la disminución del tránsito intestinal, el sobrecrecimiento bacteriano y el aumento de la permeabilidad intestinal. Pasamos a comentarlos:

Tránsito intestinal disminuido.

El consumo de alcohol tiene efectos sobre la motilidad y ritmo intestinal. Por un lado, al interferir con la reabsorción de Na^+ y H_2O , característicamente produce diarrea. Sin embargo, también se ha demostrado que el alcohol es capaz de disminuir la motilidad gastrointestinal, lo cual podría explicar en parte un mayor tiempo disponible para el paso de gérmenes de la luz a la sangre (Bode et al, 2003).

Sobrecrecimiento bacteriano.

El estasis intestinal comentado anteriormente puede contribuir al sobrecrecimiento de gérmenes gramnegativos en el tubo digestivo, lo que determina una mayor carga neta de LPS. Este hecho ha sido demostrado elegantemente en un modelo murino en el que la descontaminación intestinal con antibióticos redujo el daño hepático producido por una dosis posterior de etanol (Adachi et al, 1995).

Aumento de la permeabilidad intestinal.

Sin duda el mecanismo más importante que determina el aumento de la endotoxemia en el alcohólico y por ende, el aumento de LPS que llega a la célula de Kupffer es la permeabilidad intestinal aumentada que se ha observado, tanto en modelos murinos (Keshavarzian et al, 2009), como en humanos (Basuroy et al, 2005).

Dicha permeabilidad aumentada es aplicable a macromoléculas en relación directa con su peso molecular (Parlesak et al, 2000).

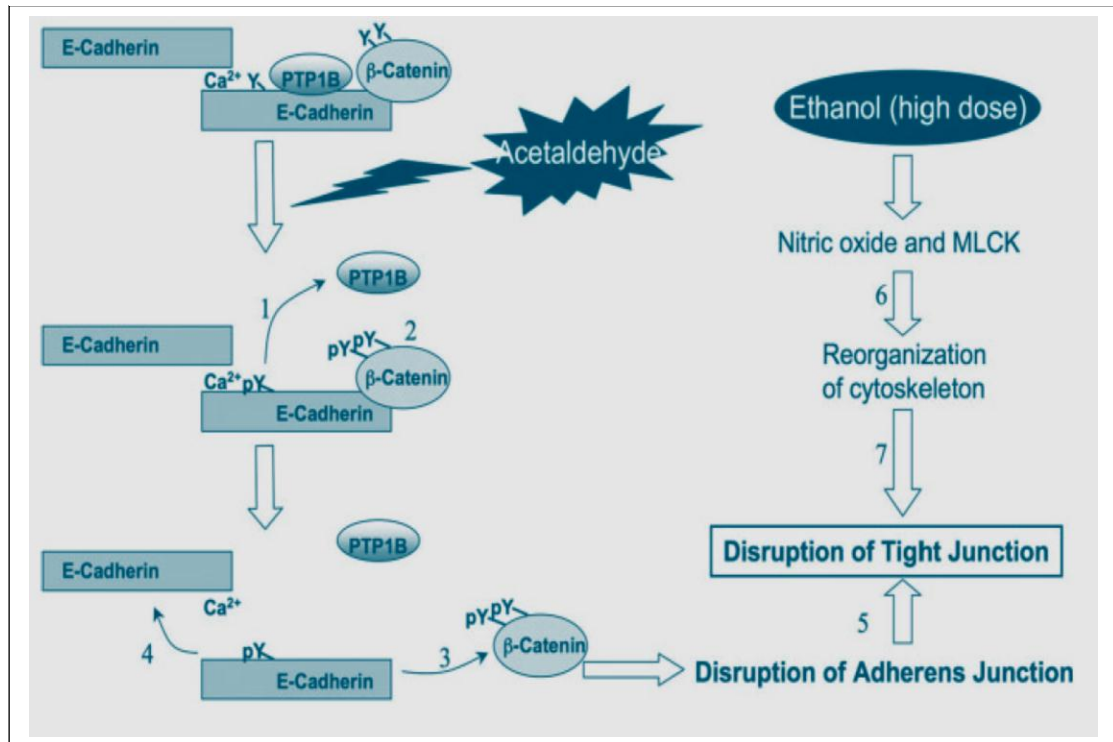
Más que el alcohol *per se*, parece ser su metabolito más inmediato, el acetaldehído, el responsable de este aumento de la permeabilidad, ya que para que el alcohol pueda ejercer una disrupción significativa en la mucosa, se requiere una concentración del orden del 1% (Carter et al, 1987). Sin embargo, se ha demostrado que si bien es posible alcanzar una concentración del 5% de etanol en la mucosa yeyunal, esta concentración desciende a 0,2-0,25% en las mucosas ileal y colónica, para una dosis de 0,8g/kg de peso (Halsted et al, 1973).

Ahora bien, se ha demostrado que mínimas cantidades de acetaldehído (del orden de 0,1-0,6 mM) son capaces de interferir con las funciones de barrera en modelos monocapa (Rao et al, 2004). La concentración de acetaldehído ya en saliva de alcohólicos puede ser del orden de 0,4 mM (Homann et al, 1997), por lo que es esperable que ésta aumente conforme se avance en el tracto gastrointestinal y el alcohol que no se absorbe se vaya metabolizando, por ejemplo, por acción de la ADH gástrica.

El acetaldehído altera las uniones paracelulares, tanto a nivel superficial (uniones estrechas, *tight junctions*, TJ) como a nivel profundo (uniones adherentes, *adherens junctions*, AJ). A nivel de las AJ, donde parece que interviene primero, el acetaldehído interfiere en la interacción E-cadherina y β -catenina, promoviendo la fosforilación de la primera mediante la inhibición de la fosfatasa de proteína tirosina 1-B (PTP1B). Dicha fosforilación disocia la unión de ambas proteínas, rompiendo *de facto*

la AJ. Una vez alterada ésta, el acetaldehído es capaz de redistribuir la ocludina y zonula-occludens-1 del citoesqueleto celular, lo que genera la disrupción de las TJ.

Figura 1.2 Disrupción de las TJ y AJ debido a etanol y acetaldehído



La resultante sería una disrupción de las uniones paracelulares que son suficientes para permitir el paso de macromoléculas por la barrera intestinal, entre las que destaca el LPS.

Inmunidad innata. DAMPs y PAMPs.

Las células del sistema inmune innato han evolucionado para producir respuestas rápidas, estereotipadas y de espectro de acción amplio, hecho que determina en parte su elevada eficacia pero también su capacidad para producir enfermedad en situaciones de descontrol. Para poder actuar rápidamente y a partir de una reserva celular limitada, los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de

Langerhans, la microglía, células de Kupffer y los granulocitos (aunque en menor medida) son capaces de reconocer (mediante los llamados receptores de reconocimiento de patrones, *pattern-recognition receptors*, PRRs) determinados esquemas moleculares llamados originalmente patrones moleculares asociados a peligro, que podemos dividir en dos vertientes diferentes:

- a) Por un lado están los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), descritos primero y encontrados en los microorganismos a una escala de conservación filogenética muy amplia (interespecies). Algunos PAMPs bien conocidos son: la flagelina (propia de bacterias, que interactúa con el TLR-5), el RNA monocatenario (vírico, bacteriano e incluso propio, que interactúa con el TLR-8) o el LPS (presente en las bacterias gramnegativas, interactúa con el TLR-4).
- b) Los “patrones moleculares asociados a lesión” (DAMPs, *damage associated molecular patterns*), descritos de forma más reciente derivan normalmente de estructuras intracelulares que son secretadas externamente mediante mecanismos independientes de la clásica cadena retículo endoplásmico-aparato de Golgi y ejercen su función en el microambiente extracelular en el delicado equilibrio redox. Un ejemplo de esto son las proteínas S100 expresadas en hepatocitos (Foell et al, 2007). En otros casos (probablemente la mayoría), los DAMP son estructuras intracelulares que una vez expuestas en el espacio extracelular, sufren cambios (normalmente oxidativos) que determinan su efecto nocivo. Tal es el caso del ácido úrico y su conversión a urato monosódico en el ambiente extracelular, rico en Na⁺ (Kono et al, 2008). En efecto, en los últimos tiempos enfermedades clásicas como la gota (Martinon,

2010) o la enfermedad de Crohn han sido incluidas entre las enfermedades autoinflamatorias, cuya patogenia se explica mediante los DAMP y PAMP y la consiguiente activación del sistema inmune innato (Wilson et al, 2010).

Hasta el momento se han descrito cuatro familias de PRRs: receptores transmembrana como los TLR o los receptores de lectina tipo-C (CLRs), aunque en ocasiones pueden encontrarse ejerciendo acciones en el citosol; otros PRRs son proteínas citoplasmáticas como receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico (*retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*, RLRs) y receptores tipo NOD (*NOD-like receptors*, NLRs). Este funcionamiento de la inmunidad innata se conoce como el “modelo de peligro” (Matzinger, 2002). A continuación pasamos a ver en detalle cómo el LPS activa al TLR-4 y qué consecuencias tiene dicha activación.

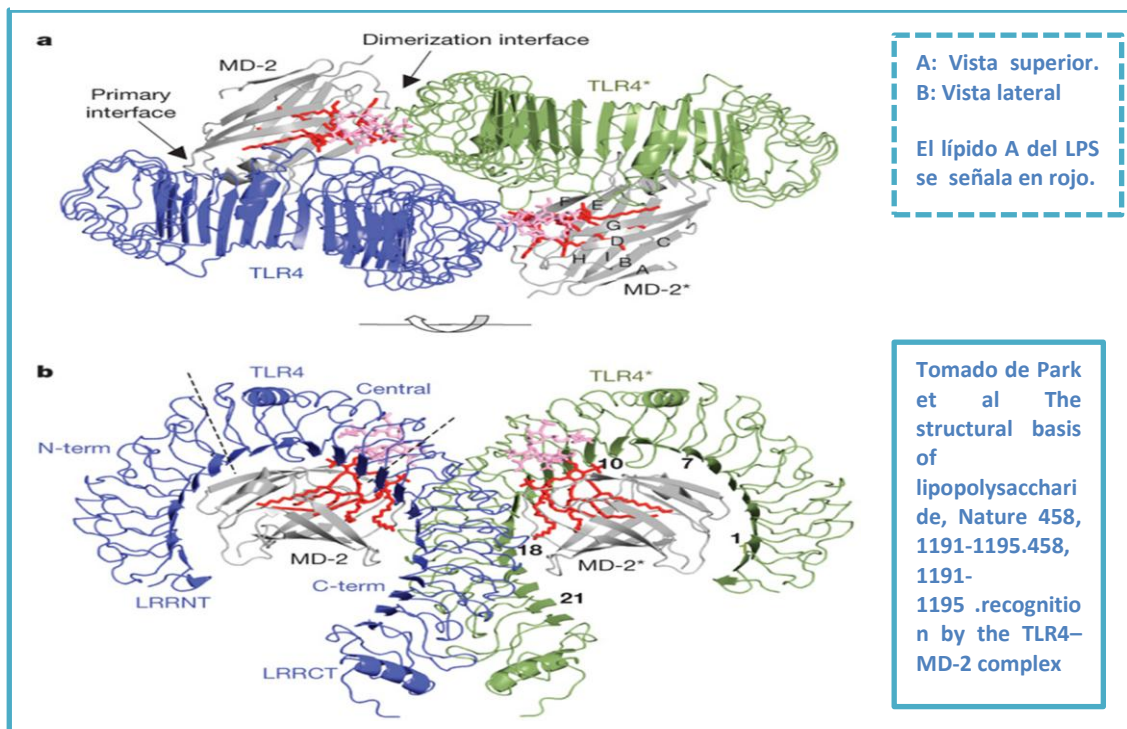
Interacción LPS-TLR-4.

Todos los TLR tienen tres dominios: el N-terminal, rico en repeticiones de leucina (*leucine-rich repeats*, LRR), la región transmembrana y el C-terminal (citósólico), conocida como dominio de homología Toll/IL-1R (TIR). Es en estos TIR donde difieren las diversas cascadas de señalización intracelular. Se han descrito cinco adaptadores que contienen dominios TIR: MyD88, el adaptador inductor de IFN- β que contiene dominio TIR (TRIF, o también TICAM-1), TRAP/Mal, la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) y la proteína estéril con motivos de armadillo (SARM).

El TLR-4 necesita del factor de diferenciación mieloide tipo 2 (*myeloid differentiation factor 2*, MD2) para reconocer al LPS. Dicho reconocimiento se lleva a

cabo mediante dímeros del complejo TLR-4-MD2-LPS. El acoplamiento del LPS induce un cambio de conformación en el heterodímero TLR-4-MD2, que resulta en el plegamiento en forma de “M” del multímero simétrico TLR-4-MD2-LPS (Fig.I 1.3). En esta unión intervienen múltiples tipos de enlace, desde interacciones hidrofóbicas hasta puentes de hidrógeno (Park et al, 2009). A continuación se expone el modelo propuesto para dicha interacción.

Figura I 1.3 Interacción TLR4-MD2-LPS



El reconocimiento del LPS por el complejo TLR-4-MD2 (y también por el heterodímero TLR-2-TLR-1/6) desencadena una serie de reacciones intracelulares que en última instancia han de activar al factor nuclear κB (NF- κB) y al factor regulador de interferón (*interferón regulating factor*, IRF), lo que determinará a su vez la

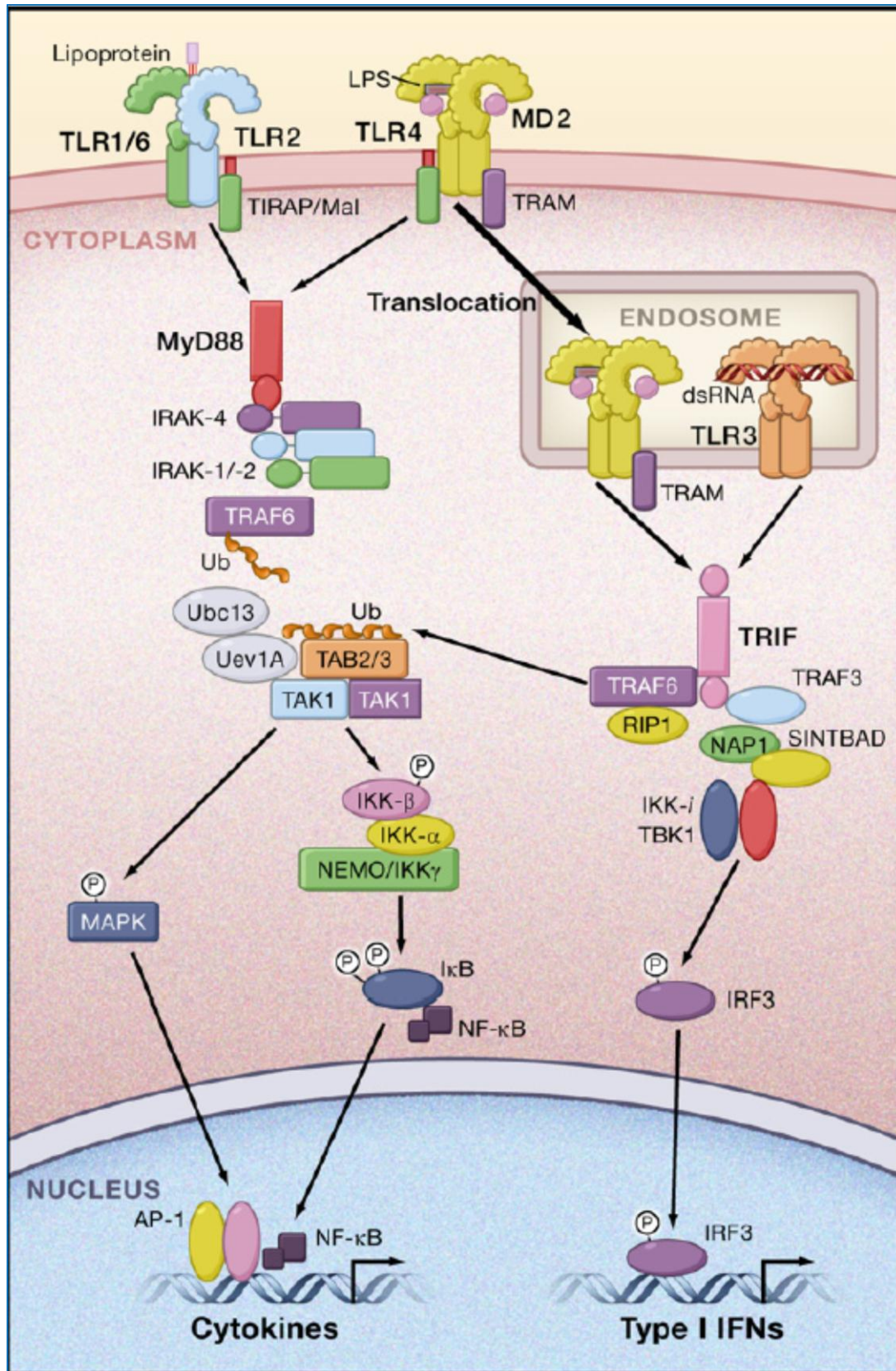
transcripción de genes codificadores de citoquinas proinflamatorias y de interferones tipo I, respectivamente.

En concreto, la interacción entre el TLR y el LPS recluta al adaptador TIRAP-Mal para establecer una interacción con MyD88. Esta molécula interactúa a su vez con la quinasa asociada a IL-1R 4 (IRAK-4), una serina-treonina quinasa. IRAK-4 activa a su vez a IRAK-1 e IRAK-2. Estas kinasas se desligan de MyD88 y activan al factor asociado al receptor del TNF 6 (TRAF6). El TRAF6 a su vez inicia dos cascadas de ubiquitinación, una cadena de poliubiquitina ligada al propio TRAF6 así como una cadena de poliubiquitina libre. Dicha cadena libre activa un complejo formado por la quinasa 1 activada por TGF- β (TAK1), las proteínas fijadoras de TAK1 (TAB1), TAB2 y TAB3. Este complejo de kinasas fosforila a su vez a la quinasa de $\text{I}\kappa\beta$ (IKK- β) y a la quinasa 6 de las MAP kinasas. Subsiguientemente el complejo IKK (formado por IKK- α , IKK- β y el modulador esencial de NF- $\kappa\beta$, NEMO) fosforila a $\text{I}\kappa\text{Ba}$, una proteína inhibidora de NF- $\kappa\beta$. Una vez fosforilada, $\text{I}\kappa\beta$ se degrada en el sistema ubiquitina-proteasoma. Este hecho libera a NF- $\kappa\beta$ para que se traslade al núcleo y active la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, la activación de la cascada de las MAP-kinasas genera la formación de otro factor de transcripción, AP-1, que también tiene como dianas a diversos genes que codifican citoquinas y del que se hablará más adelante en el apartado dedicado al TNF- α .

En el otro brazo, la interacción LPS-TLR-4 recluta al adaptador TRAM para procesar al complejo resultante en el endosoma, lo que lleva a la activación de TRIF

que a su vez activa tanto a NF- κ B como al IRF, induciendo la transcripción de genes para citocinas proinflamatorias e interferones, respectivamente (Takeuchi et al, 2010).

Figura I.4 Señalización intracelular tras interacción LPS-TLR4 y/o LPS-TLR1/6-TLR-2



(Arriba) Tomado de Takeuchi et al en "Pattern Recognition Receptors and Inflammation", Cell 140; 805-820.

Activación de la célula de Kupffer. Secreción de citocinas.

Así pues, una vez la célula de Kupffer es activada por el LPS, inicia entonces una respuesta proinflamatoria, liberando citocinas capaces de activar a los linfocitos Th-1 o antiinflamatoria (mediadas por linfocitos Th-2). Se ha sugerido que la dirección de la respuesta (pro o antiinflamatoria) podría depender en parte del patrón de consumo de alcohol -crónico frente a masivo en picos, “*binge-drinking*”- (Crews et al, 2006); en concreto, se relaciona el consumo masivo y “puntual” con un desequilibrio en favor de citoquinas antiinflamatorias y un consumo crónico con una preponderancia de las citoquinas proinflamatorias.

Cuando la respuesta se produce hacia el lado de la inflamación, la interacción LPS-TLR4-célula de Kupffer induce la secreción por parte de éstas de diversos mediadores inflamatorios, entre los que destacan el TNF- α , la IL-1, IL-6 y la quimiocina IL-8. Estas sustancias son las responsables de la llegada y activación fundamentalmente de neutrófilos, cuya acción determina el daño característico de la hepatitis aguda alcohólica.

Los pasos que conducen desde la interacción LPS-MD2-TLR-4 hasta la regulación de la transcripción de genes que codifican citocinas proinflamatorias son parcialmente conocidos y se han descrito previamente. Pasamos a repasar las diversas citocinas que intervienen en el complejo de la hepatopatía alcohólica.

Citocinas. Generalidades.

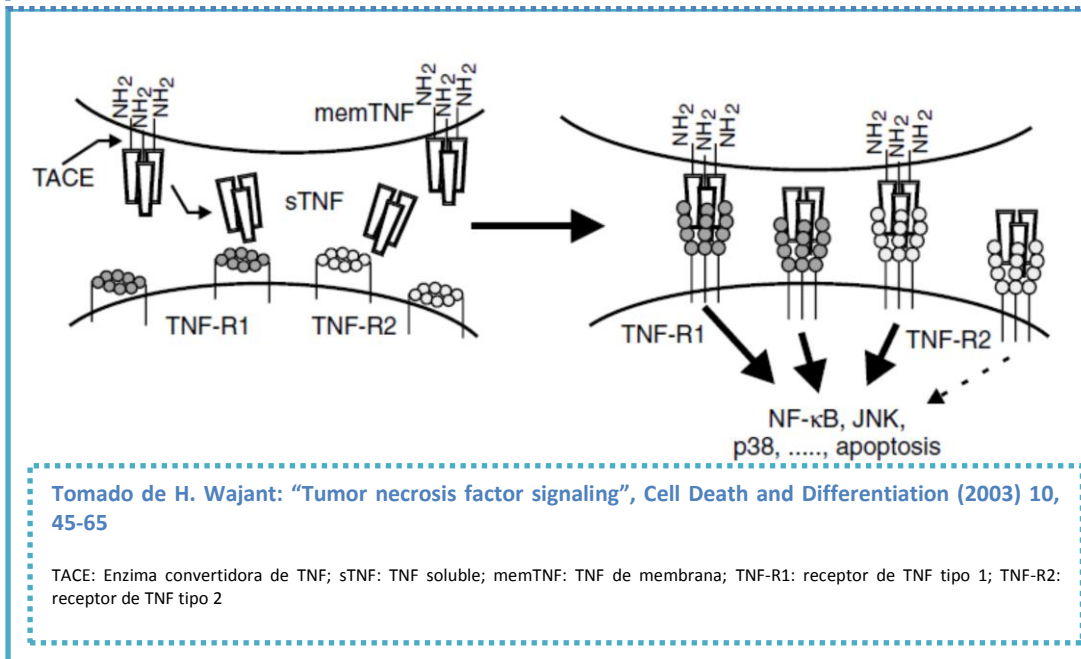
Las citocinas son glicoproteínas solubles de relativo bajo peso molecular cuya función es la de mensajeros intercelulares regulando fundamentalmente la activación de las distintas células del sistema inmune, aunque también ejercen efectos sobre la

matriz extracelular y sobre el endotelio, por citar unos ejemplos (Goronzy et al, 2008). Su función es tanto paracrina como sistémica. La mayoría actúan en el medio extracelular, bien ancladas a la membrana plasmática o en forma soluble. Son múltiples las localizaciones cromosómicas de los genes que codifican las citoquinas, si bien tienden a agregarse genes que codifican citoquinas de funciones similares en regiones próximas del mismo cromosoma, lo que ha llevado a postular que se han originado por duplicación de un ancestro común. Este hecho tendría sentido, habida cuenta que los dos calificativos que mejor describen las acciones de estas sustancias son redundante y pleiotrópico: como es sabido, una misma citoquina puede ejercer múltiples efectos diferentes (algunos de ellos incluso antagónicos entre sí) y casi cualquier efecto de una citoquina dada puede verse ejercido por otra diferente (Gutiérrez et al, 2004). A continuación pasamos a recordar la estructura y función de las principales citoquinas pro y antiinflamatorias.

TNF- α

El TNF- α se encuentra principalmente como proteína transmembrana en forma de homotrímeros cuyo PM total es de 51 kDa. La forma soluble se obtiene por separación proteolítica mediante la metaloproteasa enzima convertidora de TNF- α (*tumoral necrosis factor alfa converting enzyme*, TACE). Los monómeros de TNF- α (17 kDa) poseen una estructura con diversas disposiciones de plegamiento en β le da su característica forma de “rollito”, compartido por toda la familia de ligandos del TNF (Bazan, 1993).

Figura 1.5 Estructura esquemática del TNF, sus receptores y sus interacciones.



El espectro de actividades biológicas del TNF- α es muy amplio, pero principalmente se le puede clasificar como una citoquina proinflamatoria con algunas funciones reguladoras de la apoptosis. Su presencia en situación de enfermedad está íntimamente ligada a la destrucción tisular, aunque también se le atribuye un papel en la regeneración/expansión del tejido dañado una vez concluye la actividad inflamatoria. Actúa por medio de diversos receptores, que se encuentran en parte anclados a la membrana, y en parte, circulando.

Papel de los receptores solubles:

Parece lógico que la dualidad atribuida a algunas de las acciones del TNF- α pueda deberse a que se estimule uno u otro tipo de receptor. Esto ha sido demostrado en modelos murinos de isquemia retiniana, por ejemplo (Fontaine et al, 2002).

Mientras que el TNFR-1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, la expresión del TNFR-2 está altamente regulada y es más propia de las células

del sistema inmune. Nótese que el TNFR-2 solamente interactúa con la fracción del TNF- α anclada a la membrana (memTNF) y no con la soluble (sTNF), lo que puede determinar que su función aún no esté del todo precisada (Grell et al, 1995).

Ambos receptores son periódicamente degradados de la membrana, lo que explica que se encuentren formas solubles con potencial neutralizante, si bien su afinidad por el TNF- α es menor que la de sus contrapartidas ancladas a la membrana plasmática. Ahora bien, su existencia ha constituido la base para la síntesis de proteínas de fusión capaces de tratar eficazmente enfermedades en las que el TNF- α tiene un papel primordial (Taylor, 2001).

Señalización del TNF- α a través del TNFR-1:

El TNFR-1 también se denomina TNFR55 o 60 debido a su peso molecular. Se puede encontrar en su forma habitual, esto es, anclado a la membrana, o en forma soluble (TNFRs60).

La interacción del TNF- α con su receptor tipo 1 recluta a TRADD (*TNF receptor-associated death domain*). Esto conducirá a la activación de TRAF2 y a la kinasa que interactúa con el receptor (*receptor interacting kinase*, RIP). TRAF2 pertenece a una familia de proteínas, TRAF, que son capaces de interactuar mediante cascadas de fosforilación con multitud de otros señalizadores intracelulares, entre los que destacan las MAP kinasas. En este caso, la interacción TRAF2-TNF- α recluta al complejo IKK (ya mencionado previamente) por un lado y por otro permite que RIP active al complejo de kinasas del complejo IKK. El resultado es la exposición y activación de NF- κ B que puede resultar en diversas respuestas celulares: por un lado se podría cerrar un asa de

retroalimentación positiva con la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias (asa que se habría iniciado con la interacción LPS-MD2-TLR-4 expuesta previamente); otra opción es la regulación al alza de proteínas inhibitoras de la propia vía del NF- κ B, como pueden ser los genes I- κ B α o A20 (Beg et al, 1995); por último, los complejos solubles formados por TNF- α y TNFR-1 pueden internalizarse rápidamente y ser procesados por proteosomas y lisosomas. Estos dos últimos mecanismos impedirían que la activación del NF- κ B se retroalimentase perpetuamente (Wajant et al, 2003).

Además, la interacción TNF-TNFR-1 puede conducir a la muerte celular, tanto por la vía de la apoptosis como por la de la necrosis, ayudada en este caso por un ambiente rico en ROS o NO (Landry et al, 2001). En el primer caso, la interacción TNF-TNFR-1 activa a TRADD, quien hace de puente para la interacción con la proteína de dominio de muerte asociada a Fas (*Fas associated death domain protein*, FADD). Esto a su vez recluta a las caspasas 8 y 10, lo que facilita la activación autoproteolítica de estas proteínas y puede iniciar una cascada de señalización que conduce a la célula a la apoptosis. Por otra parte, la interacción TNF-TNFR-1 puede reclutar, como ya vimos previamente, a TRADD para a su vez activar a TRAF2 y RIP, pero en este caso, en lugar de producirse la activación de NF- κ B, en presencia de un ambiente rico en ROS se puede producir daño del DNA (que sería irreparable por inhibición de PARP, *poly-ADP-ribose polymerase*) y depleción de ATP, lo que conduciría a muerte celular por necrosis (Wajant et al, 2003).

Para añadir más complejidad, las vías de señalización del TNFR-1 incluyen la activación del activador de transcripción y transductor de señal Janus (*Janus*

kinase/signal transducer and transcription activator, JAK/STAT-3), una vía fundamental para activar genes inhibidores de la apoptosis, como son AP-1 y Bcl-2 (Moriguchi et al, 1997).

Señalización del TNF- α a través del TNFR-2:

El TNFR-2 no se expresa de forma constitutiva, sino inducida, y además no puede ser activado por el sTNF, sino que precisa el memTNF para su activación. También se le ha denominado TNFR80 o TNFR75 por su peso molecular. Al igual que el TNFR-1, lo podemos encontrar anclado en la membrana o en forma soluble (TNFRs80).

Al parecer, una de las vías de señalización intracelular que derivan de la estimulación de TNFR-2 es el “agotamiento” de TRAF2 y sobre todo, de las vías protectoras que dependen de TRAF2 (por ejemplo, la del NF- κ B en lo relativo al escape celular a la apoptosis). Al mismo tiempo, parece que la activación de TNFR-2 mediante memTNF- α produce una hiperestimulación de la interacción TNF-TNFR-1, lo que unido al punto anterior puede significar un desvío en el equilibrio de las posibles cascadas de señalización intracelular a favor de la vía de la apoptosis (Wajant et al, 2003).

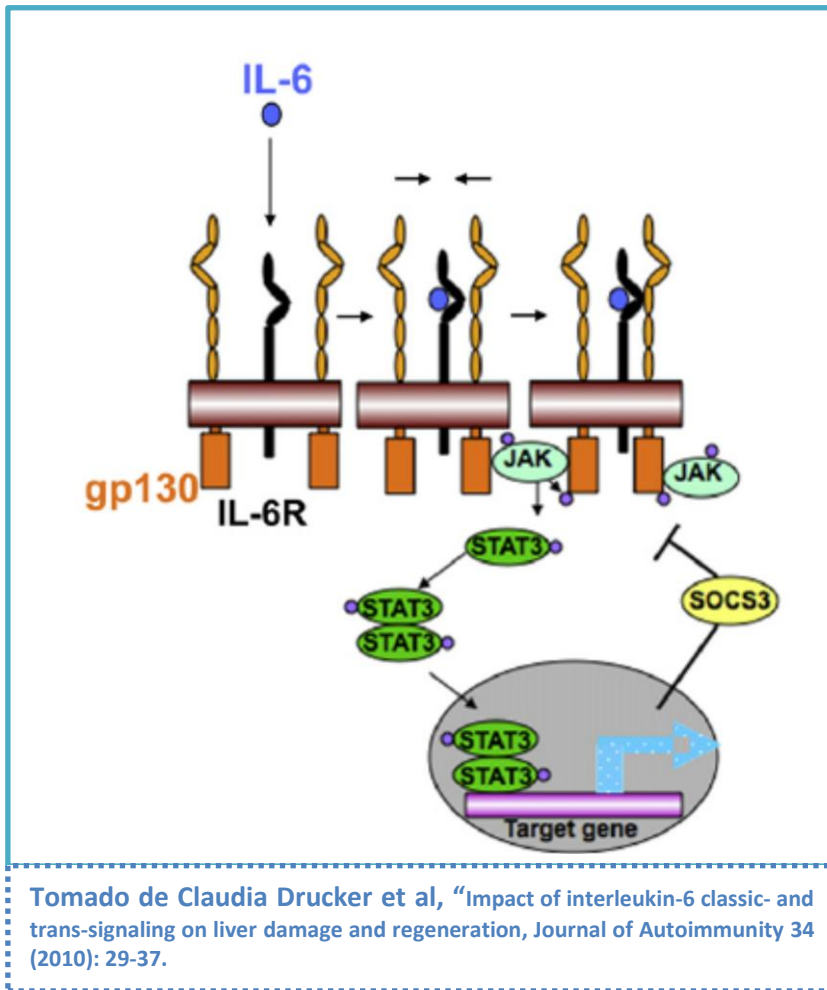
Así pues, las acciones del TNF- α están mediadas por tres vías fundamentales de señalización, que además están íntimamente interrelacionadas entre sí. Así, por la vía del NF- κ B se potencia la secreción de citoquinas proinflamatorias y señales antiapoptóticas; por la vía de las MAP kinasas y JNK kinasas se estimula la proliferación celular y por último, interviene en los dos mecanismos básicos de muerte celular (apoptosis y necrosis) en presencia/ausencia de las caspasas y de factores reguladores como FADD.

El equilibrio que gobierna todas las posibles acciones del TNF- α aún no está definido en profundidad, pero lo inespecífico de su espectro de acción puede ayudar a comprender la ingente cantidad de propiedades biológicas que se atribuyen a esta molécula. Parece claro actualmente que la hepatitis aguda alcohólica es una enfermedad en la que el TNF- α juega un papel esencial y por eso hemos explicado en detalle su biología. Sin embargo, hay algunos datos que sugieren que lo realmente lesivo para el hepatocito en la génesis de la hepatopatía alcohólica es la unión del TNF- α al receptor p55 (Naveau et al, 2005). De hecho, el cociente TNFRs75p/TNFR55p puede ser considerado un marcador (inverso) de severidad de la hepatitis alcohólica. Así, unos valores bajos de dicho cociente determinado al inicio de la enfermedad y un descenso de los mismos entre el 1º y 15º días del proceso se asocian a un peor pronóstico (Naveau et al, 1998).

IL-6

La IL-6 pertenece a la familia de las citoquinas tipo gp130, entre las que se cuentan la IL-11, la cardiotropina-1 o la IL-27, por poner tan sólo unos ejemplos. Actúa a través de un complejo que contiene una subunidad formada por la gp130 (que es un receptor de transducción de señales). Para que esta interacción se lleve a cabo, es preciso que antes la IL-6 se una con su receptor de membrana, IL-6R, y será este complejo IL-6/IL-6R el que interactuará con gp130, lo que a su vez conducirá a la activación de señalización intracelular por las vías Jak/Stat y Ras/Map/Akt (ver figura I 1.6). Esta es la vía clásica de señalización de IL-6, que es válida para diversos tipos celulares, entre los que se encuentran el hepatocito, el neutrófilo, las células de estirpe macrofágica y algunos linfocitos.

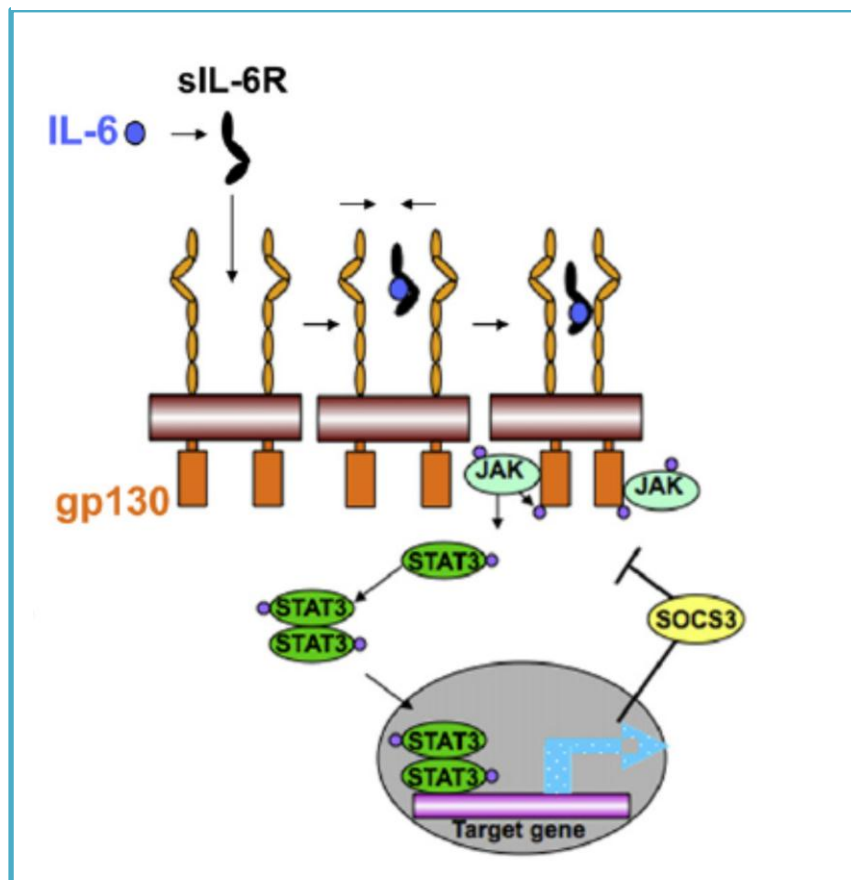
Figura I I.6 Señalización canónica de IL-6



Ahora bien, existe otra forma de actuación de IL-6, y es a través del receptor soluble de IL-6, IL-6Rs, que circula libremente (señalización *trans*). La interacción IL-6/IL-6Rs es capaz de activar a la gp130 presente en la membrana plasmática de una pléyade de tipos celulares. Este hecho por sí solo explica efectos de la IL-6 más allá de las células de la inmunidad y los hepatocitos mencionados anteriormente, pero además en alguna de estas células, como es el caso del hepatocito o los progenitores

hematopoyéticos, la presencia de gp130 en la membrana plasmática es muy importante (Drucker et al, 2009). Diversos autores han demostrado que la activación de IL-6 mediante su receptor soluble tiene un efecto multiplicativo sobre sus acciones en estas células (Peters et al, 1998).

Figura 11.7 Señalización “trans” de IL-6 a través de sIL-6R



Tomado de Claudia Drucker et al, "Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration, *Journal of Autoimmunity* 34 (2010): 29-37.

La IL-6 ejerce sus efectos regulando la transcripción de una serie de genes a través de la vía JAK/SAT, que como se ha inferido previamente, está implicada en la

transcripción de genes relacionados con la proliferación celular. Por este motivo se considera a la IL-6 un regulador de la respuesta al estrés biológico, que puede ir desde la mera adaptación al ejercicio físico (Hoene et al, 2010) hasta la génesis de metástasis óseas y progresión tumoral (Ara et al, 2010).

Como ocurre con todas las citoquinas, los efectos de la IL-6 a menudo pueden considerarse pleiotrópicos, redundantes, e incluso antagónicos entre sí. Su función como mensajero de respuesta al insulto celular implica su presencia en condiciones de lesión celular, y en ocasiones ésta será sinónimo de mayor daño tisular, tal vez al perpetuar la supervivencia de células que deberían iniciar apoptosis, pero también puede significar un marcador de regeneración tisular, lo que puede hacer que interpretar su presencia sea difícil. En este sentido, se ha encontrado que la adición de IL-6 previa a una lesión celular importante (como un modelo murino de hepatotoxicidad inducida por Concanavalina A) resulta protectora para el tejido estudiado, y sin embargo, la exposición a IL-6 posterior al contacto con la noxa favorecía el mayor daño tisular (McLoughlin et al, 2000).

IL-8

La IL-8, también llamada CXCL8, es en realidad una quimiocina proinflamatoria perteneciente a la familia de quimiocinas tipo CXC. La forma producida por células ajenas al sistema inmune consta de 77 aminoácidos, y la producida por células de la inmunidad consta de 72. La diferencia en su producción radica en la modificación postrasduccional que sufre el péptido codificado por el gen de la IL-8, que tiene una

longitud de 99 aminoácidos y luego será modificado según la estirpe de la célula donde es producido.

La expresión de IL-8 está estimulada primordialmente por acción de NF- κ B, de lo que es fácilmente deducible que un ambiente “rico” en TNF- α o IL-6 promueva la consiguiente secreción de IL-8 por las células vecinas. Otros factores como estrés biológico (quimioterápicos, radiaciones ionizantes, por ejemplo) o fármacos (glucocorticoides, por ejemplo), también estimulan la secreción de IL-8.

La IL-8 ejerce sus acciones por medio de dos receptores anclados a la membrana plasmática, que son CXCR1 y CXCR2. Ambos comparten estructuras muy similares, lo que ha llevado a sugerir un origen común por duplicación génica. Se trata de receptores transmembrana acoplados a proteína G. Se ha descrito una mayor selectividad en el caso de CXCR1, que solamente se activa mediante la interacción con IL-8 y con la proteína quimiotáctica de granulocitos tipo 2, mientras que múltiples quimiocinas pueden estimular a CXCR2.

Por lo tanto, las acciones de la IL-8 van a venir determinadas por la gran diversidad de respuestas que a partir de las proteínas G se pueden desencadenar. Así, por un lado, a través de la activación de fosfatidilinositol-3-kinasa, que a su vez activa a la serina-treonina-kinasa Akt, se estimula la migración de neutrófilos hacia el sitio de acción por una vía independiente de la de las MAP-kinasas (Knall et al, 1997). De igual modo, la activación de los receptores de IL-8 acoplados a proteína G puede desencadenar la activación de la fosfolipasa C y proteína-kinasa C, lo que por una parte puede cerrar un asa de retroalimentación positiva sobre NF- κ B y por otro puede modificar la concentración intracitoplasmática de Ca²⁺ y llevar a la polimerización de

filamentos de actina, con la consiguiente modificación del citoesqueleto celular, sobre el cual también puede actuar la fosfatidilinositol-3-kinasa.

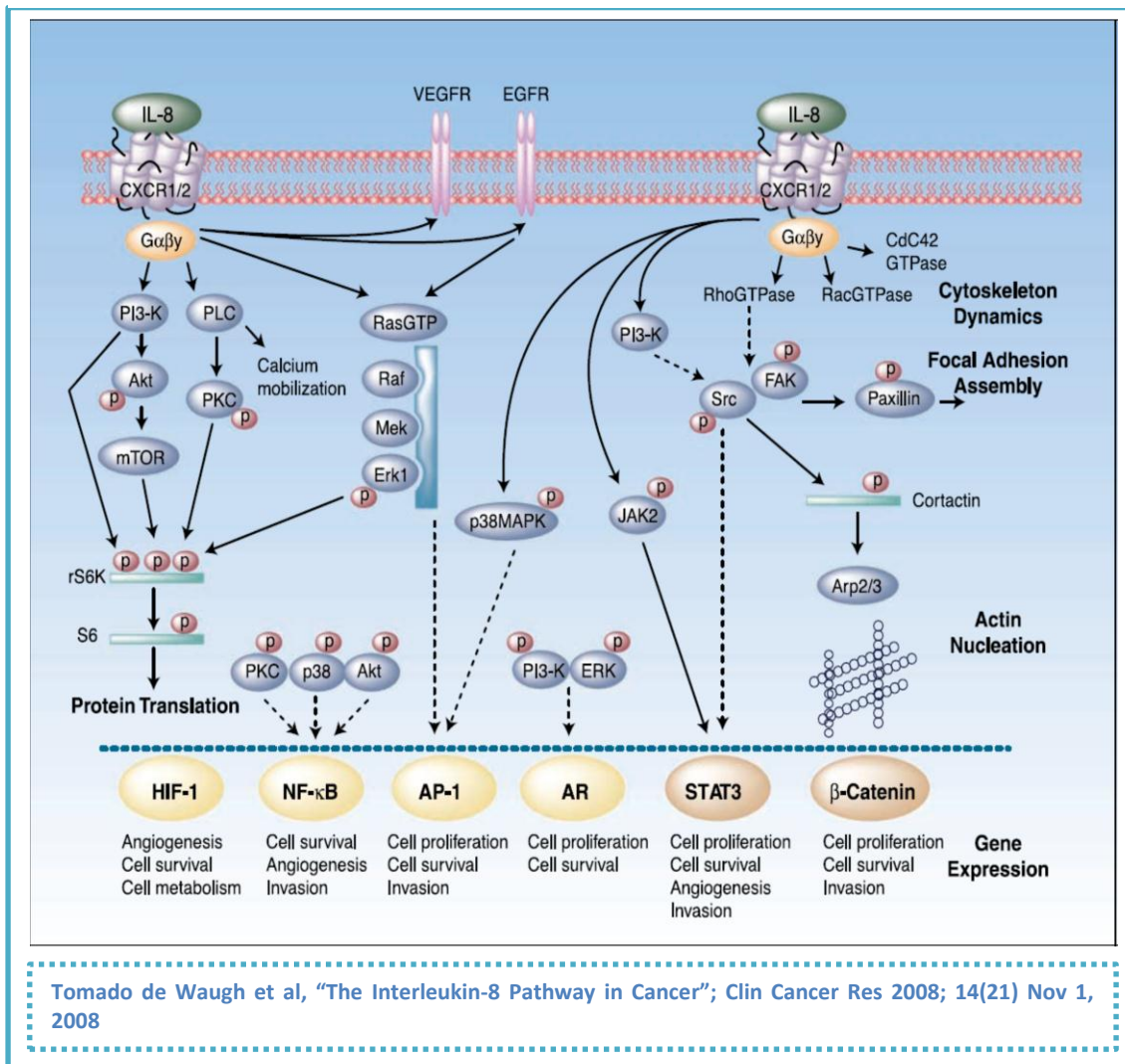
Además, la activación de proteína G mediante CXCR1 o CXCR2 puede activar la vía de Ras acoplada a GTP, lo que conduce a una cascada de fosforilación que acaba activando al factor de transcripción AP-1, ya visto anteriormente. En la activación de este factor también puede influir el hecho de que IL-8 también es capaz de activar las MAP-kinasas acopladas a factor p38.

IL-8 puede también modificar al alza la expresión de receptores de membrana para factores de crecimiento, como son los casos de VEGFR y EGFR.

Como último ejemplo, a través de IL-8 se puede activar la vía JAK2-STAT3, ya mencionada antes en el caso del TNF- α y de la IL-6. Un resumen de todas las acciones expuestas anteriormente se puede observar en la figura I 1.8.

Así pues, IL-8 influye fundamentalmente en la quimiotaxis de neutrófilos, en la modificación del citoesqueleto celular y en la capacidad de proliferación celular/capacidad de elusión de señales apoptóticas (Waugh et al, 2008).

Figura 1.8 Vías de Señalización de IL-8



IFN-γ

El IFN-γ pertenece a la familia de interferones tipo II. Se trata de una citoquina central en la regulación de la respuesta inflamatoria. Su descubrimiento está ligado a la función primordial que se atribuye a estas citoquinas, la defensa ante la infección vírica.

El IFN-γ actúa mediante su unión a su receptor IFN-R, un heterodímero anclado a la membrana cuya activación induce una cascada de fosforilación que desemboca en la activación de los señalizadores intracelulares JAK-2/STAT (fundamentalmente

STAT1). Dicha activación, de forma análoga a otras citoquinas, conduce a la transcripción de genes que codifican proteínas que tienen que ver con la respuesta inflamatoria, con la proliferación celular y con la elusión de la apoptosis.

El IFN- γ es el principal mediador de la activación de los macrófagos. Dicha activación puede ser explicada por dos mecanismos básicos: por un lado, es capaz de incrementar la respuesta “normal” de los macrófagos a la activación de sus TLR, fenómeno que se ha denominado *priming* (“imprimación”) (Schroder et al, 2006). Este fenómeno conduce a una mayor activación de NF- κ B y por ende, a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, se ha descrito que el IFN- γ puede actuar inhibiendo los mecanismos de retroalimentación negativa que se generan por la propia activación del macrófago mediante sus TLR. Un ejemplo de esto es la capacidad que tiene el IFN- γ de inhibir la interacción IL-10/STAT3 que se activa de forma automática cuando el macrófago es estimulado mediante sus TLR. Dicha interacción tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del macrófago, por lo que la supresión de esta vía mediante IFN- γ por sí sola puede determinar un efecto activador sobre el macrófago (Mosser et al, 2008).

Las acciones del IFN- γ lo sitúan como “pieza maestra” en el equilibrio que debe reinar en la respuesta inflamatoria en cuanto a la interacción destrucción-aclaramiento/regeneración. Uno de los mecanismos por los que ejerce esta última acción (más a favor de regeneración que de destrucción) es inhibiendo la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), serina-proteasas, componentes del complemento o enzimas implicadas en el metabolismo de las prostaglandinas (Ho et al,

2008). Otra forma en la que el IFN- γ es capaz de atenuar el daño inflamatorio sobre los tejidos es promoviendo una limitación de la infiltración tisular por neutrófilos y monocitos.

Este papel de “llave maestra” puede tener que ver con las acciones que la activación de la vía JAK2/STAT1 puede ejercer sobre otras vías JAK/STAT, activadas por otras citoquinas. Estos efectos reguladores/inhibitorios pueden ejercerse mediante la activación de proteínas SOCS (inhibidoras intrínsecas de las vías derivadas de STAT), bloqueando los sitios de activación de STATs diferentes a STAT1 o activando la degradación proteosómica de las STATs reguladas (Hu et al, 2009).

De esta forma, el IFN- γ estimula la secreción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12. Pero además, como se ha expresado anteriormente, es una de las principales fuentes de activación de las células de estirpe macrófaga, y es también un potente activador de las células NK.

Además de ser el principal activador de los macrófagos el IFN- γ es, ante todo, una citoquina principal en la activación de los linfocitos Th-1. Así, su propia secreción es capaz de amplificar las respuestas Th-1 así como de suprimir la diferenciación y proliferación de otras subestirpes de linfocitos colaboradores. Un ejemplo de esta acción es la supresión de la vía de señalización IL-4-STAT6, que es crucial para la diferenciación de linfocitos Th-2 (Naka et al, 2001).

IL-12

La IL-12 pertenece a una subfamilia de interleuquinas que constan de heterodímeros muy similares entre sí, y entre las que destaca, además de la propia IL-12, la IL-23, una de las principales reguladoras de la proliferación y diferenciación de

linfocitos Th-17 (Langrish et al, 2004). Se han descrito dos subunidades para esta citoquina, caracterizadas como IL-12p40 e IL-12p70.

El receptor de IL-12 es un complejo transmembrana formado por dos subunidades: IL-12R β 1 e IL-12R β 2. Su activación conduce a una cascada de transducción de señales intracitoplásmicas mediadas por el complejo JAK2/STAT. En concreto, se ha postulado a STAT4 como el principal factor de señalización último de IL-12. STAT4 promueve la transcripción de genes que codifican proteínas de respuesta netamente inflamatoria, como puede ser el IFN- γ mencionado anteriormente.

La secreción de IL-12 está estimulada por la presencia de todo tipo de noxas. Es una de la primeras interleuquinas secretadas durante la respuesta inflamatoria, fundamentalmente por parte de células dendríticas. Es por tanto, capaz de activar a las células macrofágicas, pero no sólo de forma indirecta, estimulando la secreción de IFN- γ , sino también ejerciendo un efecto directo sobre estas células. Además, su presencia es crucial para el mantenimiento de una respuesta Th-1, y de hecho, es el declive en sus niveles lo que suele marcar un cambio en el equilibrio Th-1/Th-2 a favor de estos últimos (Lyakh et al, 2008).

IL-4

La IL-4 es la citoquina principal de señalización de los linfocitos Th-2. Se trata de una glicoproteína de 15 kDa aproximadamente cuya estructura terciaria está bien descrita (Powers et al, 1993). Actúa mediante su interacción con dos tipos de receptores descritos hasta este momento. Como en casos anteriores, estos receptores

tienen estructuras heterodiméricas, con el interés añadido en el caso de la IL-4 de que uno de los heterodímeros incluye una de las subunidades del receptor de IL-13, lo que puede explicar parte de la superposición entre las acciones de ambas citoquinas. Así, los dos heterodímeros posibles que resultan en los dos receptores de IL-4 son, por un lado el formado por la propia proteína de unión a IL-4 (IL4R- α) y la llamada “cadena común γ ” (γc), y por el otro, la formada por IL-4R- α e IL-13R- $\alpha 1$ (Hage et al, 1999).

La vía fundamental de señalización de IL-4 es a través de las ya citadas quinasas JAK acopladas al factor de transcripción STAT (en este caso STAT 6). La cascada de fosforilaciones que conduce a la activación de STAT6 motiva por parte de éste último la inducción de la expresión del gen GATA-3. Dicho gen se ha postulado como señalizador “maestro” de las respuestas Th-2. La expresión de este gen conduce a su vez a diversos efectos: el principal es la diferenciación de los Th-0 hacia Th-2, lo que abre un asa de retroalimentación positiva con una mayor secreción de IL-4; por otra parte se suprimen las repuestas proinflamatorias Th-17, así como la diferenciación de células hacia Th-1 y la expresión de IFN- γ . Se inhibe la producción de IL-6 y de TNF- α , y también de IL-1 (directamente por inhibición de la activación de NF- $\kappa\beta$ e indirectamente interfiriendo entre otras con la diferenciación y proliferación de células de estirpe macrófaga), mientras se potencia la secreción de IL-10. Se induce el cambio de isotipo de inmunoglobulina desde IgM hacia IgE y se estimula la expresión de moléculas del CMH-II, así como de VCAM-1, respuestas estas que colocan a la IL-4 como principal coordinador de la respuesta alérgica (Scott et al, 2010).

Se postula que la secreción inicial de IL-4 podría provenir de las propias células Th-0, tal vez en respuesta a un ambiente netamente proinflamatorio o como resultado

del estímulo de una noxa alérgica o de naturaleza helmíntica. Otras células que son capaces de secretar IL-4 son los basófilos y mastocitos, los eosinófilos y las células NKT.

IL-10

La IL-10 es una citoquina con funciones eminentemente reguladoras, con efecto tanto sobre la actividad Th-1, como la Th-2 así como sobre las células presentadoras de antígeno en general y las células de estirpe macrofágica en especial. Tiene la particularidad de que para ser activa debe formar homodímeros. Éstos actúan a través de dos receptores de membrana, IL-10R1 e IL-10R2. La activación de estos receptores desencadena a su vez la activación de diversas vías de señalización intracelular, como es la vía de la MAP-quinasas y, sobre todo, la vía JAK1/STAT1 y JAK1/STAT3. Esto conduce, como se ha visto previamente, a la activación de la transcripción de determinados genes que codifican proteínas que serán las que determinen la respuesta celular a la IL-10. Dicha respuesta consiste a su vez en inhibir la secreción de IFN- γ e IL-2 por parte de las células Th-1, la de IL-4 e IL-5 por parte de las células Th-2, así como la de IFN- γ y de TNF- α por parte de los macrófagos. También reduce la expresión celular de ICAM-1, moléculas de CMH-II y de moléculas coestimuladoras de los linfocitos como CD28 (Commins et al, 2008).

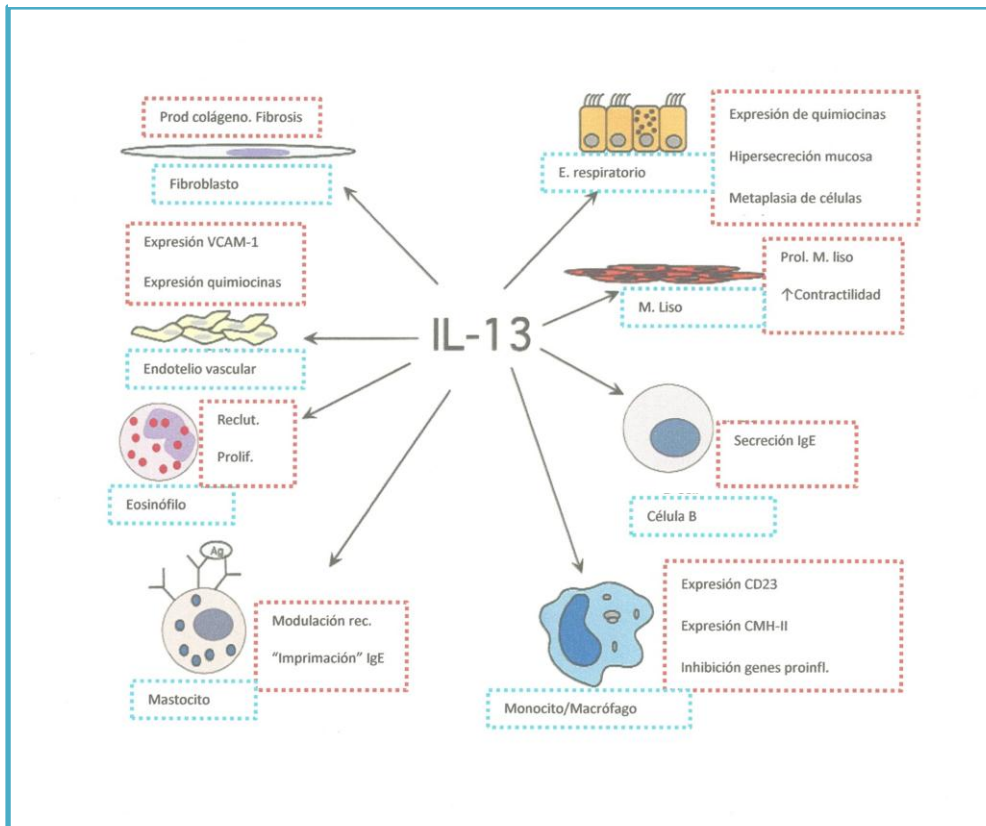
IL-13

La IL-13 es una glicoproteína cuya estructura primaria consta de 132 aminoácidos y en cuyo sitio activo la semejanza con la IL-4 es notable, lo que explica la capacidad de esta última de unirse a la subunidad 1 del receptor de IL-13, ya citada anteriormente. Se trata de otra citoquina importante en la respuesta Th-2 y cuenta

con receptores en linfocitos B, basófilos/mastocitos, eosinófilos, células endoteliales, monocitos/macrófagos, células del epitelio respiratorio, fibroblastos y células musculares lisas. La IL-13 tiene dos tipos de receptores descritos, el primero el heterodímero IL-4R- α /IL-13R- α 1 y el segundo IL-13R- α 2, cuyas funciones no están aún bien descritas. La activación del primer receptor conduce una vía de señalización intracelular muy similar a la explicada para IL-4, a través de JAK/STAT6 con la consecuente transcripción de genes reguladores de citoquinas Th-2 y funciones supresoras de acciones Th-1. Cabe destacar, en el caso de IL-13, que su papel en la respuesta Th-2 es más como efector que como director, ya que, al contrario que en la IL-4, no se han descrito receptores de IL-13 en células T (Hershey et al, 2003).

En la figura I I.9. se resumen algunos de los efectos de IL-13, la mayoría de los cuales han sido mencionados en el caso de IL-4.

Figura I 1.9 Efectos de IL-13



Tomado de Hershey: IL-13 receptors and evolving pathways: an evolving web; J. Allergy Clin. Immunol.; abril 2003

Hemos expuesto hasta aquí cómo, en virtud sobre todo de un incremento de la permeabilidad intestinal, un exceso de lipopolisacárido llega a estimular los TLR-4 de la célula de Kupffer, generando de esta manera una producción exagerada de citoquinas, proinflamatorias inicialmente, pero luego también derivadas de las células Th-1 y Th-2. Estos fenómenos juegan un papel esencial en la patogenia de la lesión hepática inicial; con el tiempo, sin embargo, se asiste a una tolerancia al LPS, con mayor producción de citoquinas Th-2, que marca en cierta medida la evolución futura de la hepatopatía, ya que estas citoquinas pueden ser fibrogénicas.

Tolerancia al LPS:

La tolerancia al LPS se puede definir como la respuesta reducida frente al LPS tras un primer contacto con la endotoxina. Fue descrita por primera vez en 1946 (Beeson, 1946). Se trata de un fenómeno complejo que se ha relacionado en diversos estudios con una mayor supervivencia en situaciones tales como es shock séptico, tanto en modelos animales como en modelos de experimentación humanos. Desde el punto de vista molecular se produce un cambio en el perfil de citoquinas predominantes tras exposiciones consecutivas al LPS, con una disminución de citoquinas de perfil Th-1 y un aumento de las de perfil Th-2, que sin embargo no se traduce necesariamente en una menor capacidad de las células de estirpe monocito-macrofágica para producir daño oxidativo (Fernandes et al, 2010). El cómo se produce este fenómeno de tolerancia es un proceso no bien conocido en detalle para el que se postulan diversos mecanismos. Por un lado parece que se produce una regulación a la baja en la cascada de fosforilaciones que siguen a la activación del TLR4 por parte del LPS y que han de conducir a la activación de NF- κ B. Asimismo, la repetida exposición al LPS puede aumentar la cantidad disponible de homodímeros p50 de dicho factor de transcripción (que son biológicamente inactivos) en detrimento del heterodímero p50/p65 (que es el verdadero efector). En el ámbito extracelular se ha descrito la presencia de moléculas capaces de neutralizar al LPS, por una parte y de sustancias capaces de desensibilizar a los monocitos y macrófagos ante la endotoxina, por otra. En el primer caso, se ha demostrado que una fracción soluble de CD14, así como proteínas de unión a LPS solubles son capaces de secuestrar a esta molécula. En este mismo sentido, parece que las lipoproteínas plasmáticas pueden tener un efecto análogo (Kitchens et al, 2001). En cuanto a la presencia de sustancias desensibilizantes

a la acción del LPS cabe mencionar varias moléculas, como pueden ser la IL-10 o el TGF- β . También las prostaglandinas y las catecolaminas son capaces de inducir un fenotipo de tolerancia al LPS.

Mención aparte merece la IL-12. La exposición a LPS aumenta los niveles de IL-12, que es como se vio anteriormente uno de los iniciadores de la respuesta Th-1 y uno de los principales responsables de su mantenimiento. Ahora bien, se ha demostrado que la presencia repetida de LPS estimula de forma preferente la aparición en el medio extracelular de IL-12p40. Se ha descrito que los homodímeros de IL-12p40 tienen un efecto inhibitor sobre el IL-12R (Lauw et al, 2000).

En el caso de la hepatopatía alcohólica, se podría afirmar, que –al menos para el alcohólico crónico- existe un contacto crónico y aumentado con el LPS. Las reconocidas respuestas proinflamatorias derivadas de la interacción LPS-TLR4 conducen por un lado a una respuesta inicialmente de predominio Th-1. Sin embargo, el mantenimiento de este estímulo lleva a la larga a un cambio de perfil hacia las citoquinas de perfil Th-2. El “interruptor” de este cambio bien podría ser el acúmulo de IL-12p40 con su capacidad inhibitoria sobre el importante estímulo de esta citoquina para la secreción de IFN- γ y por tanto, para el mantenimiento de una respuesta netamente Th-1. Aparecería entonces una transición de la oxidación/destrucción hacia la regeneración/fibrosis, mediada por las citoquinas derivadas de los Th-2. Además no habría que olvidar que el mantenimiento del hábito alcohólico y por ende, del aumento de LPS disponible para la célula de Kupffer no disminuye la capacidad de ésta para generar daño oxidativo, lo que explica que en la hepatopatía alcohólica puedan

convivir diversos estadios evolutivos clínicos e histológicos en un mismo paciente al mismo tiempo.

Estrés oxidativo y peroxidación lipídica

Por estrés oxidativo se conoce a una situación de desequilibrio entre la presencia de ROS y la capacidad celular para neutralizarlas. Estas moléculas son por lo general pequeñas, altamente reactivas y se producen como consecuencia de reacciones normales del metabolismo celular, si bien en situaciones de enfermedad su génesis puede estar aumentada.

Se puede considerar que hay fuentes endógenas y exógenas de ROS. Entre las primeras encontramos algunos subproductos de las reacciones de la cadena respiratoria mitocondrial, los citocromos P450, ciertas enzimas oxidativas (como son la xantino oxidasa, la aldehído oxidasa, las ciclooxigenasas, la monoaminoxidasa o el complejo oxidasa de NADPH) y el metabolismo oxidativo de diversas biomoléculas (grupos HEM, catecolaminas, quinonas y tetrahidrobiopterinas). Las fuentes exógenas de ROS incluyen las radiaciones ionizantes, la luz UV, y diversos fármacos y tóxicos como puede ser el propio etanol. Al margen de su potencial lesivo que se comentará posteriormente, las ROS generadas tienen un papel destacado en los mecanismos de comunicación intra- e intercelular e intervienen en la patogenia de la hepatopatía alcohólica.

Buena parte del daño que se produce por ROS viene dado por la existencia de reacciones en cadena, en la que al generarse un radical libre (reacción de iniciación), éste se consume oxidando a un sustrato vulnerable, generando a su vez otro radical altamente reactivo a partir del mismo. Éste, a su vez, continúa la cadena (propagación)

hasta que tiene lugar una reacción de terminación, lo que ocurre cuando la concentración de radicales libres alcanza una masa crítica y la probabilidad de reacción radical-radical es elevada. Afortunadamente en el organismo existen mecanismos de control que impiden la perpetuación de estas reacciones con su tremendo potencial lesivo.

Algunos ejemplos de ROS son: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), peroxinitrito ($OONO^-$), radical oxhidrilo ($\bullet OH$) y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) generados como consecuencia de las reacciones en cadena expuestas anteriormente.

Efectos de las ROS:

Las ROS afectan a múltiples estructuras intracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos o los componentes lipídicos de las membranas, fenómeno que se conoce como peroxidación lipídica. En este último caso, suelen ser los residuos de ácidos grasos poliinsaturados los que reaccionan preferentemente, debido sobre todo a la presencia de dobles enlaces que genera puntos vulnerables en la molécula, ya que los hidrogeniones ligados a grupo metileno son altamente reactivos.

Las consecuencias de la peroxidación lipídica no se limitan únicamente al daño estructural. También los productos finales de estas reacciones son lesivos por distintos mecanismos. Tal es el caso del 4-hidroxinonenal (4-HNE) y del malondialdehído (MDA), capaces de reaccionar con la desoxiguanina y desoxiadenosina, generando aductos de DNA (Marnett, 1999), que les confiere una naturaleza mutagénica. Además, el MDA

puede unirse a proteínas y generar aductos proteicos, capaces de activar al sistema inmune específico, generando autoanticuerpos.

No sólo el MDA, un producto final de la peroxidación lipídica, es capaz de generar aductos de ácidos nucleicos y proteínas. También el principal metabolito del etanol, el acetaldehído, genera aductos alterando las características estructurales de moléculas propias y transformándolas en inmunogénicas. A este hecho ya nos habíamos referido anteriormente. Además el MDA puede acoplarse al acetaldehído y generar estructuras aún más reactivas.

Las ROS son capaces de inducir la ciclooxygenación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana, como el ácido araquidónico, generando en vez de prostaglandinas los llamados γ -cetoaldehídos. Éstos reaccionan a su vez con proteínas y ácidos nucleicos con una velocidad varios órdenes de magnitud mayor que el propio MDA o el 4-HNE. Al parecer su génesis viene mediada necesariamente por dos mecanismos celulares, por un lado la interacción TNFR-1/CYP2E1 (independiente de las prostaglandinas) y por el otro por la propia vía de la ciclooxygenasa (Roychowdhury et al, 2009).

Por tanto, la peroxidación lipídica es deletérea por tres mecanismos fundamentales: el primero, por el riesgo de pérdida de la integridad de las membranas celulares, con el consecuente riesgo de necrosis y mayor generación de estímulo oxidativo y proinflamatorio; segundo, por la generación de intermediarios altamente reactivos capaces de inducir la formación de aductos proteicos, con las consecuencias que se han expuesto; finalmente, y en tercer lugar, por la generación de productos finales con capacidad mutagénica y de propagación de la cadena oxidativa.

La implicación de los aductos de proteínas es objeto de intensa investigación en la patogenia de múltiples entidades, que van desde la arterioesclerosis a la Enfermedad de Alzheimer o el Lupus Eritematoso Sistémico, pasando evidentemente por la hepatopatía alcohólica. Los aductos proteicos son deletéreos por dos mecanismos fundamentales: de un lado la proteína alterada pierde su función biológica, y de otro, el compuesto resultante es inmunogénico, activando la respuesta inmune específica con la consecuente génesis de anticuerpos y la llegada de células efectoras del sistema inmune, como ya se ha expresado.

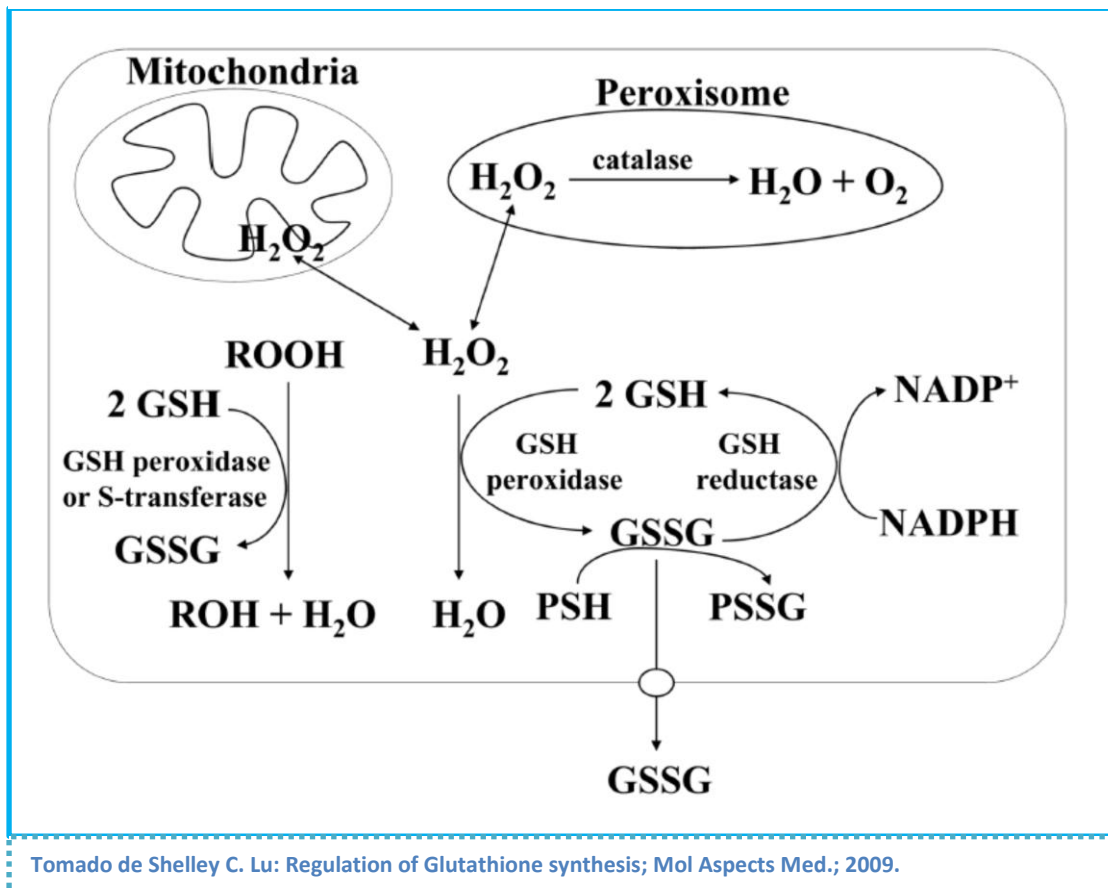
Mecanismos de defensa ante ROS:

El organismo tiene la capacidad de defenderse del daño que supone la generación y presencia prologada de ROS en el entorno celular. Se trata en su mayoría de varios tipos de enzimas que reaccionan rápidamente con estas especies para dar reacciones de neutralización o generar especies menos reactivas. Así, la práctica totalidad de las células poseen los siguientes sistemas enzimáticos:

- a) Superóxido dismutasas (SODs). Degradan O_2^- para dar H_2O_2 . Se han descrito isoformas citosólicas y mitocondriales, dependiente la primera del Cu y Zn y la segunda del Mn.
- b) Catalasa: neutraliza H_2O_2 y genera agua y oxígeno. Presente únicamente en los peroxisomas.
- c) Sistema glutatión-peroxidasas (GSH): reaccionan con H_2O_2 para dar agua y O_2 o agua y disulfuro de glutatión. El sistema del glutatión es el más importante de los sistemas enzimáticos antioxidantes del organismo, por lo que su adecuado

funcionamiento es esencial. Es un sistema que se autorregenera involucrando diversos pasos enzimáticos que precisan de sustratos cuya disponibilidad es crítica para su homeostasis (Fig. I I.10).

Figura I I.10 . ROS. Detoxificación mediante GSH



Tomado de Shelley C. Lu: Regulation of Glutathione synthesis; Mol Aspects Med.; 2009.

Aparte de esto, existen muchos otros sistemas antioxidantes, bien sean específicos para reacciones concretas o bien circulantes, entre los que cabe destacar:

- Metaltioneínas, HEM-oxigenasas, tioredoxina: eliminan diversas especies reactivas.
- Ceruloplasmina y ferritina: “secuestran” metales de transición, que son cofactores esenciales en múltiples reacciones oxidativas.

c) Vitaminas A, E, C, D, bilirrubina, ácido úrico.

Etanol y peroxidación lipídica.

El etanol genera un exceso de ROS tanto directa como indirectamente. Como hemos visto, el metabolismo del etanol tiene lugar mediante reacciones oxidativas. La catalasa acoplada a la NADPH oxidasa es una de las vías metabólicas del etanol, pero quizá el mecanismo principal por el cual el etanol genera un exceso de ROS reside en la inducción del microsoma hepático propio del alcohólico (Cederbaum et al, 2009). Al margen de eso, el etanol activa otros dos mecanismos que generan un exceso de ROS. Por una parte el aumento de permeabilidad intestinal ya comentado activa los TLR de la célula de Kupffer induciendo a ésta a producir un exceso de ROS. Por otra parte, el consumo crónico de etanol aumenta la absorción intestinal de hierro y genera una acumulación excesiva del mismo en el organismo. El Fe es un potente oxidante ya que puede transformar oxidantes débiles como el H_2O_2 en ROS altamente reactivos como el radical oxhidrilo mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que se enuncian a continuación:

Figura I 1.11 Reacción de Fenton

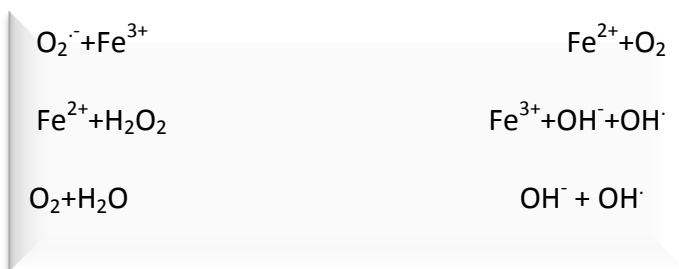


Figura I 1.12 Reacción de Haber-Weiss



Patogenia de la hepatopatía alcohólica.

Los mecanismos hasta ahora detallados concurren en la génesis de la hepatopatía alcohólica, como pretendemos exponer, de forma sintética, a continuación.

En la patogenia de la hepatopatía alcohólica influyen como mínimo dos hechos relevantes: por una parte el efecto directo del etanol y el acetaldehído y por otra parte la modulación que sobre el mismo ejercen diversos mediadores bioquímicos, fundamentalmente las citoquinas.

El etanol se metaboliza a acetaldehído, inicialmente por la vía de la ADH, lo que conlleva una alteración del equilibrio redox. Esta metabolización genera un exceso de hidrogeniones que en principio pueden ser “neutralizados” por el aporte de oxígeno en el área 1 de Rappaport. No olvidemos la estructura microscópica del lobulillo hepático, en el que se distinguen tres zonas: por una parte el área periportal, donde el aporte de oxígeno es máximo, una zona intermedia, y una zona pericentral (área 3 de Rappaport), donde la tensión de O₂ es menor, por haber sido consumido previamente a lo largo del eje sinusoidal. Por eso, las primeras lesiones observables en la hepatopatía alcohólica se aprecian en la región pericentral. Así, el exceso de equivalentes reducidos tiene una acción marcada sobre el metabolismo lipídico, promoviendo por una parte la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos y por otra parte inhibiendo la β -oxidación de Knoop, con el consiguiente resultado de esteatosis (Pessayre et al, 1999).

A este concepto clásico bien documentado hay que añadir los efectos recientemente descritos de diversas citoquinas. La hepatopatía alcohólica debe considerarse como una enfermedad en principio relacionada con el exceso de TNF- α .

Se sabe que entre otras muchas funciones esta citoquina inhibe la acción de la adiponectina, lo que favorece muchos de los efectos sobre el metabolismo graso que se acaban de comentar. Por ejemplo, el déficit de adiponectina, promovido por el TNF- α activa los enzimas involucrados en la síntesis de ácidos grasos, como la acetilcoenzima-A-carboxilasa y la sintetasa de ácidos grasos (You et al, 2009) constituyendo esto un ejemplo más de cómo incluso en las fases tempranas de la enfermedad, las citoquinas tienen un papel relevante. Es más, se ha demostrado experimentalmente que el tratamiento con adiponectina impide el efecto sensibilizador sobre la secreción del TNF- α que ejerce el LPS sobre la célula de Kupffer. Al parecer este fenómeno está mediado por la vía IL-10/HEM-oxigenasa (Mandal et al, 2010), pero también existe independientemente del concurso de IL-10 (Folco et al, 2009).

Si bien influye el exceso de equivalentes reducidos en la inicial acumulación de grasa en el hepatocito del paciente alcohólico, en el paciente bebedor crónico esta situación se agrava aún más al activarse en ellos la segunda vía metabólica importante comentada a propósito del metabolismo del etanol, que es el sistema MEOS. Recordemos que este sistema precisa de oxígeno, por lo que al incrementarse el consumo de éste en el área 1 de Rappaport, se agravan las condiciones metabólicas que propician la acumulación de grasa en el área 3 de Rappaport. A este efecto inductor de la síntesis hay que sumar la inhibición de la β -oxidación secundaria a la prioridad que tiene el metabolismo del etanol en el hepatocito, lo que implica el consumo preferente de NAD para esta vía. Además de la alteración metabólica intrahepatocitaria, en el alcohólico crónico, quizá en relación con un estado

hiperadrenérgico mantenido (Süfke et al, 2009), se observa un aumento de la lipólisis, lo que implica una mayor llegada de ácidos grasos libres al hígado.

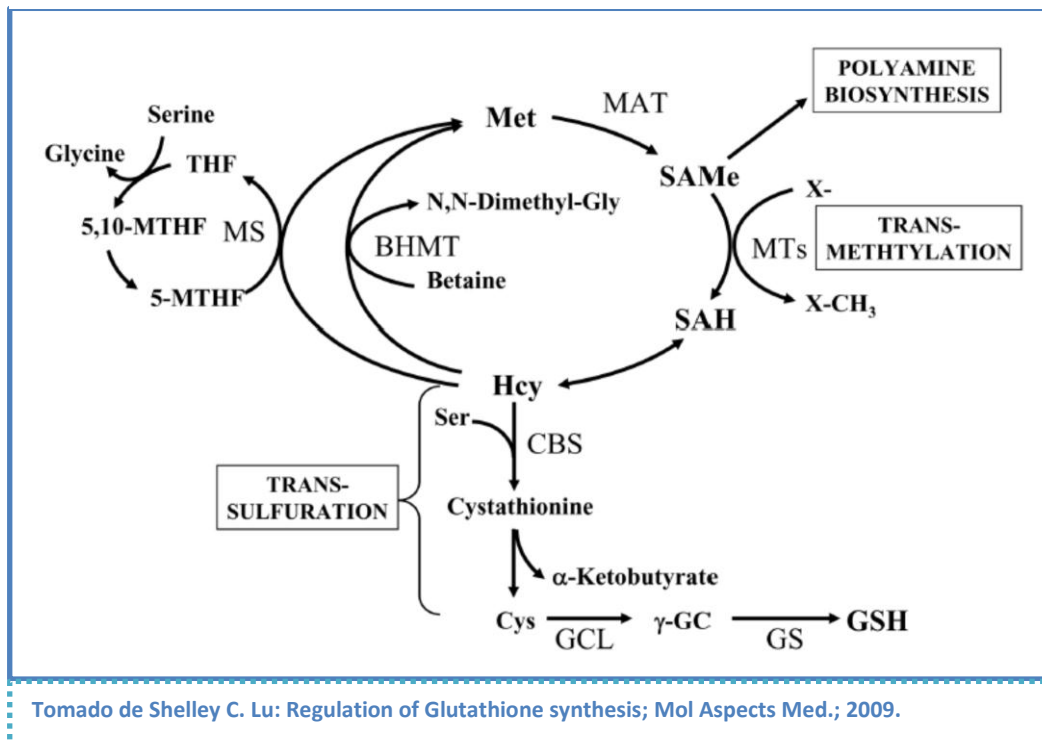
Desde el clásico artículo de Baraona (Baraona et al, 1977) se sabe que en el hepatocito esteatósico, un 50% del incremento de peso de la célula obedece a la grasa acumulada, pero el otro 50% a proteínas retenidas y al agua acumulada en relación al efecto osmótico que éstas ejercen. La acumulación de proteínas dentro del hepatocito es un fenómeno complejo en el que influye la alteración del sistema microtubular microfilamentoso posiblemente relacionada con la alteración que en su estructura provoca el acetaldehído, pero sin duda también en alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma (Donohue et al, 2007) relacionadas con el exceso de citoquinas proinflamatorias. Lo cierto es que la acumulación de proteínas en la célula hepática contribuye a su lesión y muerte. Este fenómeno de acumulación de grasa, proteínas y agua, se conoce como balonamiento hepatocitario y se observa característicamente en las fases iniciales en el área 3 de Rappaport.

El hepatocito cargado de grasa se convierte en una diana para la peroxidación lipídica. Como ya comentamos, una de las consecuencias de la activación de la célula de Kupffer por acción del LPS, es la producción de ROS. La lesión oxidante, juega un papel esencial estimulando la producción de citoquinas por parte de las células afectas.

El hepatocito dispone de diversos sistemas capaces de neutralizar el exceso de radicales de oxígeno activo que se han mencionado anteriormente, como por ejemplo el sistema del glutatión, la SOD y la catalasa. Estos mecanismos defensivos se ven comprometidos en el alcohólico crónico. El principal metabolito del alcohol, que es el acetaldehído, es un compuesto altamente reactivo. Se conoce que se une al GSH,

formando complejos hemiacetal e inhibiendo su función. Por otra parte, la síntesis de glutatión en el alcohólico crónico está alterada, ya que la vía metabólica que conduce a la síntesis de cisteína a partir de metionina (vía de la trans-sulfuración) se ve afectada (Lee et al, 2004); un esquema de dicha vía se aprecia en la figura I I.13.

Figura I I.13 Metabolismo de la metionina. Trans-sulfuración para generar GSH.



Además en el alcohólico hay una depleción de oligoelementos clave para su funcionamiento, como son el Se y el Zn. Por otro lado, la actividad de las SODs, Zn, Cu y Mn dependientes, también disminuye en el alcohólico, posiblemente por la defectuosa absorción y/o aporte de estos elementos, que condicionan unos niveles tisulares bajos, aunque el aporte exógeno de zinc no modifica esencialmente el curso de la enfermedad, al menos en modelos experimentales (González-Reimers et al, 2005).

Por lo tanto, los sistemas defensivos del hepatocito frente a la lesión oxidante están comprometidos, pero además la producción de ROS está aumentada. No olvidemos que no sólo es la excesiva producción por parte del macrófago cercano, sino que la propia inducción del MEOS que se observa en el alcohólico crónico genera mayor cantidad de ROS.

Los lípidos, junto con el DNA, son moléculas especialmente sensibles a la lesión oxidante, formándose productos altamente lesivos para la célula que provocan necrosis celular. También se genera MDA y los TBARS. Y además, como se comentó antes, la acumulación de ROS en el hepatocito induce la síntesis por parte de éste de citoquinas proinflamatorias, entre ellas el TNF- α , IL-6, IL-1, e IL-8, que atrae a células fagocíticas generando el infiltrado inflamatorio característico de la hepatitis alcohólica. La actividad de estas células fagocíticas, con liberación de enzimas lisosomales y radicales superóxido, O₂⁻ y H₂O₂ contribuye aún más a la acumulación de ROS.

Para continuar con nuestro resumen, no debemos olvidar lo comentado a propósito de la capacidad del acetaldehído para formar “aductos” con muy diversas proteínas citosólicas, propiedad compartida con el malonildialdehído. Esto genera la formación de neoantígenos, capaces de estimular al sistema inmune específico (Tuma et al, 2002). Es frecuente hallar en biopsias hepáticas de pacientes alcohólicos hepatocitos, muchas veces cargados de hialina de Mallory, en proceso de necrosis, y rodeados de una corona linfocitaria primero y de células polimorfonucleares, fenómeno conocido como satelitosis. De hecho, se interpreta que la propia hialina de Mallory es una estructura derivada de la alteración del sistema microtubular hepatocitario, con capacidad inmunogénica propia.

Por lo tanto, aunque el alcohol *per se* provoca esteatosis, lo que puede generar necrosis hepatocelular e infiltrado inflamatorio, contribuyendo fuertemente a estos efectos las citoquinas liberadas, a lo largo de la evolución de la hepatopatía se suma a los mismos una alteración inmune específica.

La inmunidad específica juega un papel relevante en la progresión de la hepatopatía etílica (Zetterman et al, 1981). No sólo hay que considerar el efecto de los autoantígenos mencionados, sino recordar también que la activación de los linfocitos T depende también en gran medida de la acción de las citoquinas proinflamatorias. El reclutamiento de células inmunes no se restringe únicamente al linfocito T4, sino también al T8. Recordemos que hay varias subpoblaciones de linfocitos T4, incluyendo, Th-1, Th-2, T-reguladores y Th-17. Estas células se diferencian por el patrón de citoquinas que secretan. El principal producto de los Th-1 es el IFN- γ . Parece que en las fases iniciales de la hepatopatía etílica predomina la activación de los Th-1, en probable relación con la secreción de IL-12 por parte de las células macrofágicas estimuladas. Posteriormente se produce el interesante fenómeno conocido como tolerancia al LPS, que hemos comentado previamente y que explica que paulatinamente descienda la secreción de IL-12 por parte del macrófago activado, y por lo tanto IFN- γ , reduciéndose así la inhibición sobre la diferenciación de los CD4 *naïve* hacia Th-2. Parece que en fases más avanzadas de la hepatopatía se produce un cambio en el perfil de citoquinas que traduce a su vez un cambio en la proporción de poblaciones linfocitarias.

La última fase histológica de la hepatopatía alcohólica se caracteriza por el depósito de colágeno. Este se observa primariamente en la región pericentral, en torno a la vena centrolobulillar, configurando la clásica lesión de esclerosis pericentral, considerada por algunos como marcador de la evolución irreversible hacia fases más avanzadas de la hepatopatía etílica.

El depósito de colágena se produce en principio por dos mecanismos posibles: o bien hay un aumento de síntesis o bien un descenso de la degradación. El depósito de colágena está estrechamente relacionado con el incremento de actividad y la modificación que sufren las células de Ito (células estrelladas), de estirpe mesenquimal localizadas en el espacio de Disse. Estas células se identifican fácilmente porque están cargadas de gotas de grasa que dejan su impronta en el núcleo, alterando la configuración de éste, y cuyo número aumenta de forma manifiesta en las fases iniciales de la hepatopatía etílica. Probablemente por el influjo de citoquinas, entre las que destaca el TGF- β , estas células se transforman en miofibroblastos, enriqueciéndose extraordinariamente en mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso y sintetizan grandes cantidades de colágena, sobre todo tipo I y tipo III. La posible influencia que otras consecuencias metabólicas directas y generadas por el alcohol puedan tener sobre el depósito de colágena ha sido también objeto de estudio. Así, al haber un exceso de NADH, existe un desvío del metabolismo del piruvato hacia el lactato y hay estudios que sugieren que la acumulación de lactato es un potente estímulo para la síntesis de colágena. Por otro lado la prolin-hidroxilasa, es un enzima clave en la síntesis de esta macromolécula. Independientemente de un posible estímulo directo de este enzima por parte del etanol, la actividad de la misma es fuertemente dependiente del Zn. El déficit de Zn es común en el alcohólico y ello ha

llevado a distintos investigadores a analizar el efecto del aporte de Zn como antifibrogénico (Kang et al, 2005), (Anttinen et al, 1984), (González-Reimers et al, 2005).

Esta colágena se deposita inicialmente en el sinusoides, en forma de “membrana basal” contribuyendo al fenómeno conocido como “capilarización del sinusoides”, alteración histológica que marca un hito (negativo) en la evolución de la enfermedad hepática alcohólica. Al depositarse la colágena en el sinusoides hepático, interfiere con la función, nutritiva por una parte y “detoxificante” por otra, del hepatocito. En relación con este hecho fisiopatológico, cabe mencionar que simultáneamente tiene lugar la llamada “defenestración” del endotelio, consistente en la disminución del número de poros en el endotelio sinusoidal que contribuye también a comprometer el contacto circulación hepática-hepatocito.

En este progresivo depósito de colágena interviene también un descenso, señalado por algunos, de la actividad colagenasa (Arthur et al, 2000), relacionado al parecer directamente con el efecto del etanol sobre las metaloproteinasas.

La progresiva fibrosis guarda relación con los fenómenos de necrosis a los que antes aludíamos. Las proteínas desnaturalizadas expuestas al espacio extracelular tras la necrosis son los anteriormente mencionados DAMP, capaces de activar a las células del entorno para producir aún más citoquinas, aún más TGF- β , a mayor producción de ROS y por lo tanto a mayor lesión celular y mayor fibrogénesis. Se cierra un círculo vicioso que hace irreversible la progresión de la hepatopatía.

El hígado tiene capacidad de regenerarse, y es ésta una defensa de la víscera frente a la agresión de diversas noxas. El alcohol inhibe esta regeneración y posiblemente también por el efecto del TNF- α , quien desde luego induce apoptosis (y necrosis). La regeneración hepática por lo tanto en el hígado cirrótico es un proceso incompleto y que además se ve comprometido por la progresiva fibrogénesis, que no permite una regeneración *ad integrum* del hígado. Muchos nódulos de regeneración tienen un drenaje deficiente –carecen de vena centrolobulillar- e incluso un aporte arterio-portal defectuoso. En el alcohólico crónico expuesto a cantidades continuas de alcohol, cuya demanda metabólica facilitaba la alteración isquémica relativa, ya en el área 3 de Rapaport, se favorece la necrosis hepatocitaria en el seno de estos nódulos, por lo que la regeneración puede calificarse de ineficaz, si el paciente continúa con el hábito etílico.

Ni que decir tiene que la progresiva necrosis hepatocelular y la distorsión arquitectural generada por la fibrosis, que termina formando tabiques por donde acaba discurriendo la mayor parte de la circulación hepática (incluso con formación de cortocircuitos arterio-portales) explica las manifestaciones clínicas progresivas de estos pacientes caracterizadas por el desarrollo de un síndrome de insuficiencia hepática y un síndrome de hipertensión portal. Hay estudios que relacionan la hipertensión portal con los niveles de TNF- α , comprobando también que los tratamientos anti-TNF reducen la hipertensión portal y mejoran el flujo hepático y renal (Mookerjee et al, 2003). No obstante, actualmente se sabe que los tratamientos anti-TNF no son eficaces en la hepatopatía etílica, asociándose por el contrario a mayor mortalidad, principalmente en relación con sepsis, (O'Shea et al, 2010) (Naveau et al, 2004). Tal vez

los efectos citados obedezcan al freno de la fibrogénesis al bloquear el efecto del TNF- α .

Sería este un ejemplo más de la importancia de las citoquinas en la patogenia de esta enfermedad. Generadas inicialmente por la activación de la célula de Kupffer por los LPS que llegan en exceso por el aumento de permeabilidad intestinal, pero también las inducidas por el propio efecto deletéreo del alcohol, sus múltiples efectos explican la mayor parte de las consecuencias negativas de la hepatopatía etílica. Dada la gran responsabilidad que parecen tener, es lógico que también se relacionen con el pronóstico. Es éste uno de los principales objetivos del presente trabajo.

Si las citocinas juegan un papel tan relevante en la hepatopatía alcohólica, si al final su secreción, incrementada por la producción excesiva de ROS y por los efectos inmunogénicos de los aductos, termina activando al sistema inmune, ¿hasta cuándo se perpetúan estos circuitos de retroalimentación positiva? ¿Qué influencia tiene el que un paciente suprima del todo la ingesta etílica? La duración de una secreción aumentada de citocinas en pacientes con hepatopatía alcohólica es objeto de controversia. En los primeros seis días tras la retirada del alcohol se encuentra un marcado descenso en los niveles de IL-6 e IL-10 (González-Quintela et al, 2000). En la fase de recuperación de una hepatitis alcohólica grave, los niveles de IL-6 e IL-8 tienden a disminuir en los supervivientes, pero no en los sujetos que fallecen (Fukui, 2005). El etanol puede contribuir a la producción de citoquinas por parte de otros macrófagos, como los alveolares (Fukui, 2005). Ciertamente, se sabe que el etanol altera los niveles de citoquinas en diversos tejidos, incluyendo hígado, cerebro y

plasma, lo que puede contribuir a la disfunción orgánica crónica (Crews et al, 2006), y probablemente a una respuesta inmune anómala así como a una tendencia a las infecciones, que puede persistir hasta tres años tras el inicio de la abstinencia (Eggers et al, 2006). La malnutrición proteica, problema frecuente en alcohólicos, se asocia con mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , IL-1 o IL-6 (Ling et al, 2004), pero el tejido adiposo también puede servir como fuente continua de citoquinas inflamatorias (Rondione, 2006), contribuyendo así a la progresión de la lesión hepática y atrofia muscular (Barbieri et al, 2002). Vemos que hay resultados muy diferentes, por lo que es pertinente analizar cuál es el comportamiento secuencial de las citocinas en nuestros pacientes, si los eventuales cambios observados seis meses más tarde de la evaluación inicial tienen que ver con la abstinencia, y sobre todo, si encierran valor pronóstico. Es este otro objetivo del presente estudio.

Capítulo II

II. Objetivos

1. Determinar la relación existente entre niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-8, y receptores del TNF 1 y 2) y la presencia de hepatopatía alcohólica, comparándolos con los de un grupo control, así como la relación de estas citoquinas con alteraciones clínicas y bioquímicas propias de la enfermedad hepática alcohólica.
2. Analizar el efecto de la abstinencia alcohólica sobre los niveles de estas citoquinas, comparando las medidas inicialmente con las determinadas tras seis meses de abstinencia.
3. Analizar el valor pronóstico a largo plazo de las citoquinas antes mencionadas determinadas en el momento de inclusión de estos pacientes.
4. Analizar el valor pronóstico a largo plazo de los cambios de los niveles de citoquinas determinadas en el momento de la inclusión y seis meses más tarde.

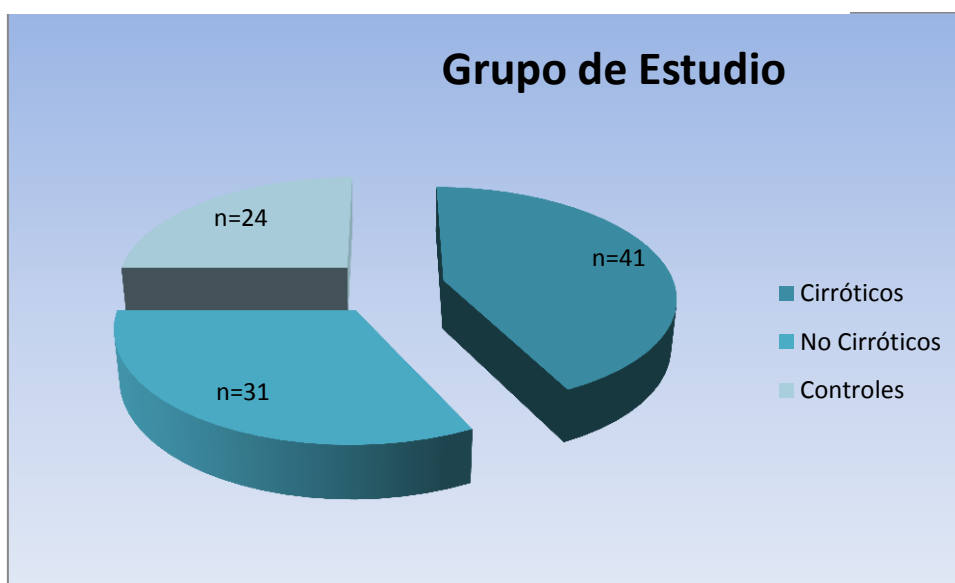
Capítulo III

III. Material y Métodos

1. Grupo de estudio.

Se analizaron un total de 96 individuos, de los cuales 24 eran controles (voluntarios ajustados por edad y sexo) y 72 pacientes alcohólicos. Entre los alcohólicos, 41 padecían cirrosis hepática y los otros 31 no. La edad media entre los pacientes fue de $50,8 \pm 12,02$ años (rango 42-58 años).

Figura III. 1 Grupo de Estudio



Todos los pacientes habían ingresado en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Canarias por algún motivo relacionado con el consumo de alcohol. Se les recomendó abstinencia alcohólica al alta, y se les citó para una nueva evaluación seis meses más tarde. 39 pacientes volvieron para esta cita.

2. Extracción de muestras. Variables estudiadas.

Los pacientes fueron evaluados desde un punto de vista clínico y analítico. La extracción de muestras tenía lugar el día del alta hospitalaria, para minimizar la posible interacción del motivo del ingreso con los valores basales de las variables analíticas

estudiadas. Las muestras de sangre eran extraídas a las 8:00 am en ayunas, para ser congeladas inmediatamente tras su centrifugación a -80 °C. Se determinaron las siguientes variables:

TNF- α

Los niveles de TNF- α se determinaron mediante análisis inmunométrico quimioluminiscente (coeficiente de variación intra-ensayo 4-6,5%, coeficiente de variación interensayo de 2,6-3,6%; recuperación 92-112%; *Diagnostic Products Corporation (DPC)* Los Angeles, CA, USA).

IL-6

La concentración de IL-6 se determinó mediante análisis inmunométrico quimioluminiscente (coeficiente de variación intra-ensayo 2,5%; coeficiente de variación interensayo de 5,7%; recuperación 85-104%; *Diagnostic Products Corporation (DPC)* Los Angeles, CA, USA).

IL-8

Los valores de IL-8 fueron determinados mediante ensayo quimioluminiscente (coeficiente de variación intra-ensayo 3,8%; coeficiente de variación interensayo de 6,7%; *DPD*, Los Angeles, CA, USA).

IL-4

La IL-4 se analizó mediante enzoinmunoanálisis (ELISA; coeficientes de variación intra e interanálisis < 10%; sensibilidad < 2pg/ml; recuperación 101%; *Bender MedSystems Diagnostics GmbH*, Vienna, Austria).

IL-10

Para esta citoquina se empleó un análisis enzimoinmunométrico (sensibilidad = 3 pg/ml; coeficientes de variación intra- e interensayo de 3,9-7,3%; recuperación de 86-94%; DPC, Los Angeles, CA, USA).

IFN- γ

Los niveles de IFN- γ se analizaron mediante ELISA (coeficientes de variación intra- e interensayo de 0,3-10,7%; sensibilidad < 1,5 pg/ml; recuperación de 90-112%; Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Vienna, Austria).

Productos de peroxidación lipídica:

Los niveles séricos de MDA, definido como sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS), fueron medidos según el método descrito por Kikugawa et al (Kikugawa et al, 1992). Se añadía muestra de 0,2 ml de plasma a 0,2 ml de H₃PO₄ (0,2 M), tras lo que se iniciaba una reacción colorimétrica añadiendo 25 μ l de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,11M. Las muestras se calentaban a 90 °C durante 45 minutos. Tras enfriar las muestras, se extraían los TBARS (complejo de color rosa) con 0,4 ml de n-butanol. La fase de butanol se separaba mediante centrifugación a 6000 x g durante 10 min. Las alícuotas de la fase de n-butanol se colocaron en una base de 96 pozos para ser leídas a 535 nm en un lector espectrofotómetro (*Benchmark Plus*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La curva de calibración se preparó con muestras estándar de MDA de 0-20 μ M. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 1,82 y 4,01 respectivamente.

Función hepática y citolisis.

Asimismo, los pacientes fueron sometidos a análisis rutinarios de laboratorio de entre los que se extrajeron variables que se comentan a continuación. Como se ha expresado más arriba, la función hepática en este estudio fue evaluada desde el punto de vista clínico y analítico. A continuación se glosan las variables de interés, habiéndose realizado las determinaciones bioquímicas mediante procedimientos rutinarios del laboratorio del HUC:

1. Lesión hepática/citolisis: se determinaron los niveles de las principales enzimas hepáticas: (GOT, GPT, GGT, FA) y de LDH, todas ellas variables cuantitativas.
2. Función hepática *per se*: para determinarla se utilizó básicamente la escala de Child-Pugh (variable categórica ordinal) en el caso de los pacientes cirróticos. Esta escala, descrita inicialmente como índice pronóstico prequirúrgico (Pugh et al, 1973) se configura asignando una puntuación a una serie de ítems que guardan relación con la insuficiencia hepática y con la hipertensión portal.

Tabla III. 1 Puntuación Child-Pugh

Medición	1 Punto	2 Puntos	3 Puntos
Bilirrubina total	< 2 mg/dl	2-3 mg/dl	> 3 mg/dl
Albúmina	> 3,5 g/dl	2,8-3,5 g/dl	< 2,8 g/dl
Actividad de protrombina	> 50%	30-50%	< 30%
Encefalopatía hepática	Ausente	Grado I-II	Grado III-IV o refractaria
Ascitis	Ausente	Responde a tratamiento médico	Refractaria

Tabla III. 2 Clasificación de Child-Pugh

Puntuación	Clase
5-6	A
7-9	B
10-15	C

Las variables clínicas relativas a esta escala (encefalopatía y ascitis) fueron consideradas en este estudio como dicotómicas (presencia o ausencia).

3. En los pacientes no cirróticos no se empleó la clasificación de Child-Pugh pero sí se emplearon las variables analíticas que la conforman.
 - a. Actividad de la protrombina. Variable cuantitativa. Expresada en tanto por ciento.

- b. Niveles de bilirrubina total. Variable cuantitativa. Expresada en mg/dl.
- c. Niveles de albúmina. Variable cuantitativa. Expresada en g/dl.

Estado nutricional:

Se evaluó el estado nutricional de los pacientes por dos métodos: por un lado, mediante una escala subjetiva validada y que ha sido empleada por nuestro grupo con anterioridad (Santolaria et al, 2000), (Suárez-Santamaría et al, 2010) y mediante una variable antropométrica estándar, el índice de masa corporal (IMC).

1. Valoración nutricional subjetiva. Se evalúan cinco localizaciones corporales, de las que tres corresponden a evaluación de la masa magra y dos a la grasa. En cada localización se asigna una puntuación que va de 0 a 2, siendo 0 lo considerado como normal y 2 como “muy desnutrido”. Estas localizaciones son: musculatura en territorio temporal, musculatura proximal de miembros superiores y miembros inferiores, así como el relieve de la bola grasa de Bichat y la grasa cutánea abdominal. El resultado de la integración de los valores de los cinco territorios es un valor que va de 0 (normal) a 10 (gravemente desnutrido). Por lo tanto esta variable fue considerada como cuantitativa.

- a. Además, la valoración nutricional subjetiva se categorizó según intervalos en 3 categorías, lo que genera una variable subrogada de tipo cualitativo ordinal:

1. Normal de 0 a 2.
2. Malnutrición leve: 3-4
3. Grave: >5

2. IMC: variable continua. Expresado en kg/m^2 . Calculado a partir del peso y la talla.

Consumo de alcohol:

El consumo de alcohol fue registrado considerando dos ejes fundamentales, siendo uno de ellos la cuantía de consumo y el otro el tiempo de evolución del alcoholismo.

1. Consumo diario de alcohol. Variable continua. Extraída a partir de los datos de la anamnesis y despejando la masa de alcohol a partir del volumen consumido, conociendo la graduación de las bebidas consumidas (fig. III.2.) y sabiendo que la densidad del alcohol es de 0,8 g/ml.

Figura III. 2 Cálculo de gramos de alcohol.

$$m[g] = \frac{V[ml] \times 0,8 \times \text{º}}{100}$$

Donde º = graduación alcohólica

2. Tiempo de consumo. Variable continua. Expresada en años, corresponde al tiempo de evolución desde el inicio del hábito etílico.

Supervivencia

La supervivencia fue valorada mediante dos variables, una de tipo evento y la otra relacionada con el tiempo:

1. Muerte. Variable dicotómica.

2. Tiempo. Variable continua. Seguimiento del paciente desde el ingreso inicial hasta el final del estudio o su fallecimiento. Expresado en meses.

Abstinencia

Se valoró si los pacientes habían observado abstinencia o no mediante una variable dicotómica.

3. Análisis estadístico

Los valores de las variables cuantitativas se expresan mediante sus medias \pm DS (y rangos intercuartílicos). Para ilustrar las diferencias de distribución entre los niveles de MDA y citoquinas con respecto a los tres subgrupos (controles, no cirróticos y cirróticos) se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando la comparación de los valores de la variable se realizaba entre dos grupos y la distribución de ésta no era de tipo paramétrico se empleó la U de Mann-Whitney. En el caso de comparación de medias para más de dos grupos con variables de distribución paramétrica, se empleó un análisis de la varianza.

Para el estudio de las correlaciones entre variables cuantitativas se empleó el coeficiente de correlación r de Pearson (variables de distribución normal) y el estadístico ρ de Spearman cuando la distribución no era paramétrica.

Para el análisis de la mortalidad se construyeron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se consideraron los estadísticos de rango logarítmico (método de Mantel) y Breslow. El mismo modelo se empleó para comprobar si las variaciones en los niveles de las distintas citoquinas influían o no en el pronóstico.

Para evaluar si los niveles de citoquinas se modificaban significativamente en relación con el hecho de observar abstinencia o no, se asumió un comportamiento lineal de esta teórica variación y se empleó un modelo de medidas repetidas, tomando como punto de partida, el valor medio de la citoquina problema en el momento del ingreso y como punto final la media de la determinación realizada a los seis meses.

Por último, para evaluar la contribución de las citoquinas y la peroxidación lipídica al pronóstico de esta cohorte se realizó una regresión de Cox, tomando dos modelos diferentes en el que las citoquinas que guardaron mayor relación con la supervivencia se confrontaban en un modelo con variables clásicas “duras” en relación con el pronóstico de la hepatopatía alcohólica.

El tratamiento informático y matemático de los datos se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS 19.0.

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética local de nuestro Hospital y se ajusta a las guías de la Declaración de Helsinki de 1975.

Capítulo IV

IV. Resultados

1. Diferencias en cuanto a niveles de MDA y de citoquinas en el momento inicial.

Diferencias en cuanto a niveles de MDA y citoquinas en cirróticos, no cirróticos y controles en el momento inicial.

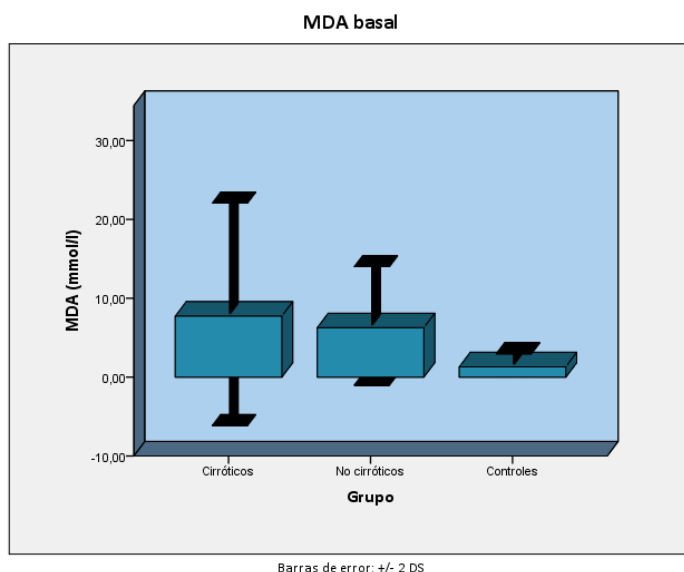
MDA:

Los niveles de MDA estaban más elevados en los pacientes cuando se comparó con los controles. Se encontraron diferencias significativas en la distribución de los niveles entre los tres grupos (cirróticos, pacientes no cirróticos y controles).

Tabla IV.1 Niveles de MDA

	Cirróticos		No cirróticos		Controles		p	KW
	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)		
MDA (mmol/l)	7,72±7,05	4,56(4,01-9,27)	6,26±3,75	5,61(3,04-9,66)	1,99±0,71	1,10(0,72-2,23)	<0,01	22,81

Gráfico IV-1 Niveles de MDA



Análisis post-hoc:

Cuando se estudiaron las diferencias entre los tres grupos en cuanto a niveles de MDA mediante un análisis *post-hoc* (prueba de Student-Newman-Keuls) identificaron dos subconjuntos diferentes: por un lado los pacientes (cirróticos y no cirróticos) y por el otro los controles.

Tabla IV.2 MDA en pacientes y controles			
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Controles	13	1,3039	
No cirróticos	14		6,2607
Cirróticos	17		7,7271
Sig.		1,000	0,426

Citoquinas proinflamatorias:

Los niveles de las citoquinas proinflamatorias estaban más elevadas en los pacientes que en los controles en el momento inicial. Se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (cirróticos, pacientes no cirróticos y controles) con respecto a los niveles de TNF- α , IL-6, IL-8, , IFN- γ y en ambos receptores solubles del TNF- α . Los niveles de MDA y de citoquinas proinflamatorias estaban más elevados en los pacientes cirróticos respecto a los no cirróticos, salvo en el caso del IFN- γ y de ambos receptores solubles del TNF- α .

Tabla IV.3 Citoquinas proinflamatorias

	Cirróticos		No cirróticos		Controles		p	KW
	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)		
TNFα (pg/ml)	10,23±10,15	7,40 (4,75-10,90)	7,21±7,75	4,00 (4,00-6,20)	5,92±1,85	5,15 (4,10-8,0)	0,03	11,58
IL-6 (pg/ml)	14,22±24,48	5,00 (5,0-12,55)	6,26±5,39	5,00 (5,00-5,00)	5,85±1,48	5,0 (5,00-6,55)	0,035	6,73
IL-8 (pg/ml)	34,57±57,30	15,20 (8,68-32,17)	26,65±34,03	8,10 (6,25-30,45)	6,63±1,57	6,80 (5,00-7,70)	<0,01	16,08
IFN-γ (pg/ml)	4,77±3,07	4,05 (2,67-6,56)	7,15±7,81	4,38 (1,4-9,15)	0,69±0,54	0,62 (0,32-1,02)	<0,001	32,98
TNFRs60 (pg/ml)	2,52±1,08	2,56 (2,06-2,87)	2,73±1,15	2,36 (2,25-2,61)	1,99±0,36	1,99 (1,8-2,46)	0,002	12,70
TNFRs80 (pg/ml)	4,28±1,38	4,72 (4,12-5,14)	4,57±0,42	4,43 (4,28-4,91)	2,19±0,45	2,01 (1,86-2,46)	<0,001	33,69

Gráfico IV-2 Niveles basales de TNF, IL-6, IFN, TNFRS60s y TNFRS80s

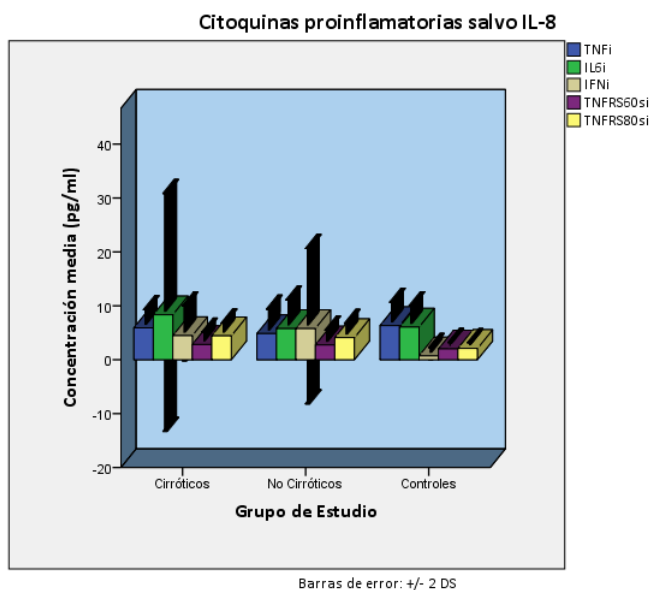
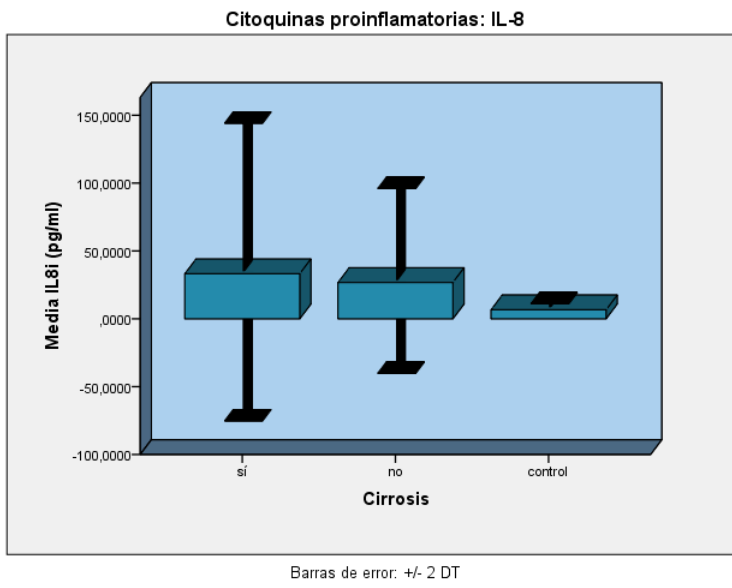


Gráfico IV-3 Niveles basales de IL-8



Citoquinas antiinflamatorias:

Se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (cirróticos, pacientes no cirróticos y controles) con respecto a las concentraciones basales de IL-4, IL-10 e IL13 entre los tres grupos.

Tabla IV.4 Citoquinas antiinflamatorias

	Cirróticos		No cirróticos		Controles		p	KW
	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)	X±DT	Mediana (Q ₁₋₄)		
IL-4 (pg/ml)	29,33±39,53	8,4(0,18-51,6)	17,07±43,20	0,12(010-2,79)	0,48±0,43	0,49(0,19-0,65)	0,005	10,62
IL-10 (pg/ml)	32,34±100,19	7,10(5,00-11,63)	6,31±1,62	5,98(5,00-7,01)	8,56±11,32	6,00(5,25-6,0)	0,0118	4,27
IL-13 (pg/ml)	34,83±37,07	18,3(7,7-64,57)	12,13±22,61	3,12(1,3-12,18)	4,71±6,36	2,86(1,19-4,27)	0,003	11,38

Análisis post-hoc:

Realizada la prueba de Student-Newman-Keuls se identificaron subconjuntos para los valores de las concentraciones iniciales de IL-13. Los pacientes cirróticos tenían niveles significativamente más elevados de esta citoquina que los pacientes no cirróticos y los controles.

Tabla IV.5 Niveles de IL-13

Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		2	1
Controles	17	4,7165	
No Cirróticos	22	12,1350	
Cirróticos	17		33,8088
Sig.		0,366	1,000

2. Citoquinas y función hepática en el momento inicial.

2.1. Relación entre los niveles de MDA y citoquinas y la función hepática en todos los pacientes en el momento inicial.

TNF- α :

Los niveles de TNF α se correlacionaron negativamente con la actividad de la protrombina ($\rho=-0,466$; $p<0,001$) y los de albúmina ($\rho=-0,385$; $p=0,001$), y positivamente con los de bilirrubina ($\rho=0,276$; $p=0,021$).

Tabla IV.6 TNF y función hepática (todos los pacientes)

		APi	Bilirrubina	Albúmina	
Rho de Spearman	TNFi	Coefficiente de correlación	-0,466	0,276	-0,385
		Sig. (bilateral)	<0,001	0,021	0,001
		N	71	70	71

Gráfico IV-4 TNF y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)

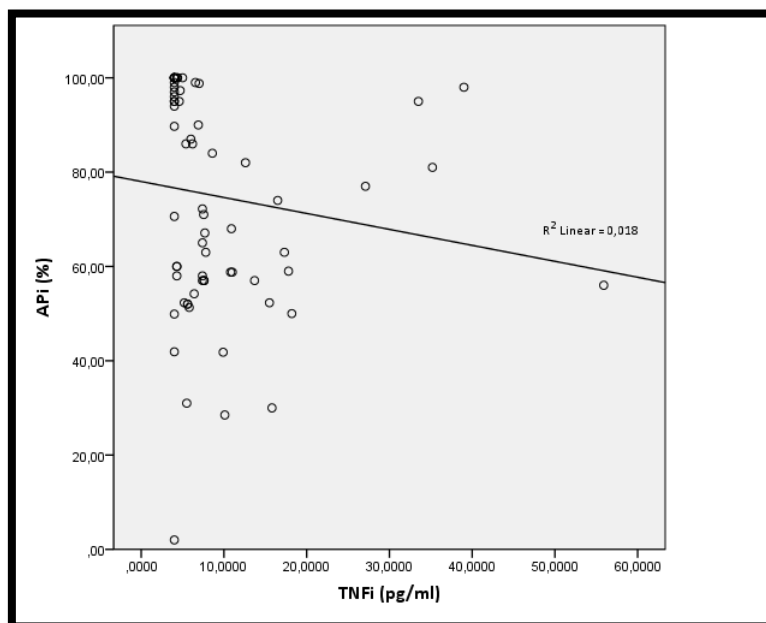


Gráfico IV-5 TNF y Bilirrubina (todos los pacientes)

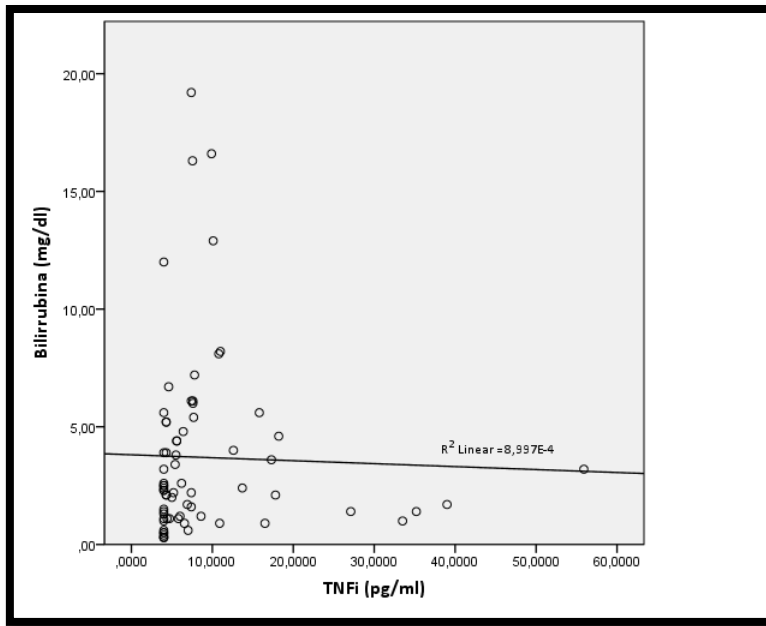
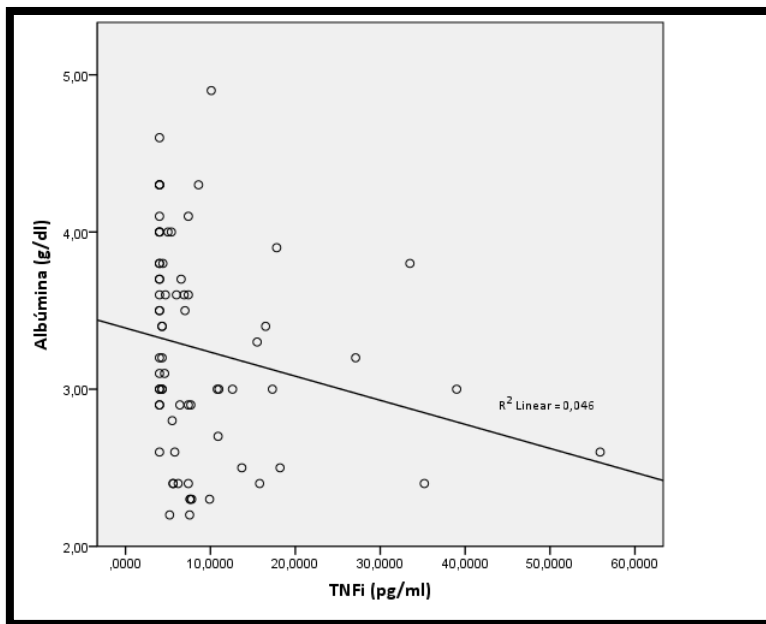


Gráfico IV-6 TNF y Albúmina (todos los pacientes)



Además, los niveles de TNF- α se correlacionaron positivamente con los de LDH ($p=0,405$; $p=0,001$), y ferritina ($p=0,261$; $p=0,037$).

Tabla IV.7 TNF y niveles de LDH y Ferritina (todos los pacientes)

		LDH	Ferritina
Rho de Spearman	TNFi	Coeficiente de correlación	0,405
		Sig. (bilateral)	0,001
		N	68

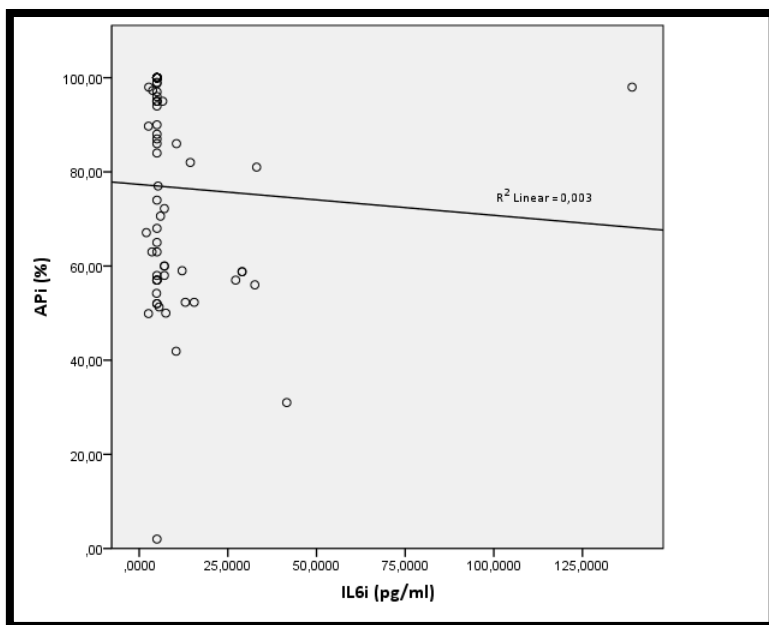
IL-6:

Los niveles de IL-6 se correlacionaron negativamente con la actividad de la protrombina ($\rho=-0,338$; $p=0,005$).

Tabla IV.8 Niveles de IL-6 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)

			Api
Rho de Spearman	IL6i	Coeficiente de correlación	-0,338
		Sig. (bilateral)	0,005
		N	67

Gráfico IV-7 IL-6 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)



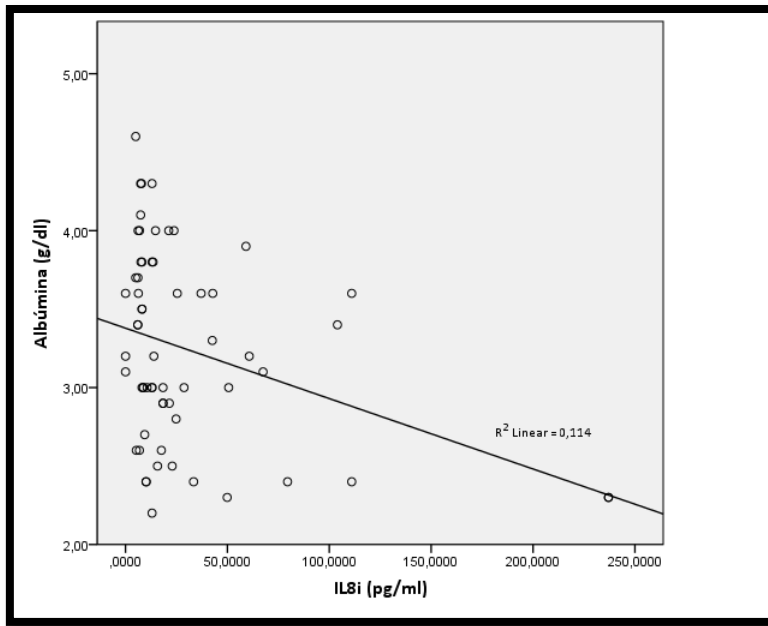
IL-8:

Los niveles de IL-8 se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($\rho = -0,352$; $p = 0,005$) y positivamente con los niveles de GOT ($\rho = 0,369$; $p = 0,003$) y de GPT ($\rho = 0,299$; $p = 0,018$).

Tabla IV.9 Niveles de IL-8 y Albúmina, GOT y GPT (todos los pacientes)

		Albúmina	GOT	GPT	
Rho de Spearman	IL8i	Coefficiente de correlación	-0,352	0,369	0,299
		Sig. (bilateral)	0,005	,003	0,018
		N	62	62	62

Gráfico IV-8 IL-8 y Albúmina (todos los pacientes)



Los niveles de IL-8 también se correlacionaron positivamente con los niveles de IgG ($\rho=0,262$; $p=0,049$).

Tabla IV.10 Niveles de IL-8 e IgG (todos los pacientes)

			IgG
Rho de Spearman	IL8i	Coefficiente de correlación	0,262
		Sig. (bilateral)	0,049
		N	57

IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ se correlacionaron negativamente con los de GOT ($\rho=-0,363$; $p=0,005$) y GPT ($\rho=-0,267$; $p=0,041$).

			GOT	GPT
Rho de Spearman	IFNi	Coefficiente de correlación	-0,363	-0,267
		Sig. (bilateral)	0,005	0,041
		N	59	59

TNFRS 1 y 2:

Ambos receptores solubles del TNF- α mostraron correlaciones negativas entre sus niveles y los de albúmina ($\rho=-0,498$; $p=0,003$ para TNFRS60s; $\rho=-0,596$; $p< 0,001$ para TNFRS80s).

			Albúmina
Rho de Spearman	TNFRS60si	Coefficiente de correlación	-0,498
		Sig. (bilateral)	0,003
		N	33
	TNFRS80si	Coefficiente de correlación	-0,596
		Sig. (bilateral)	< 0,001
		N	33

Gráfico IV-9 TNFRS60s y Albúmina (todos los pacientes)

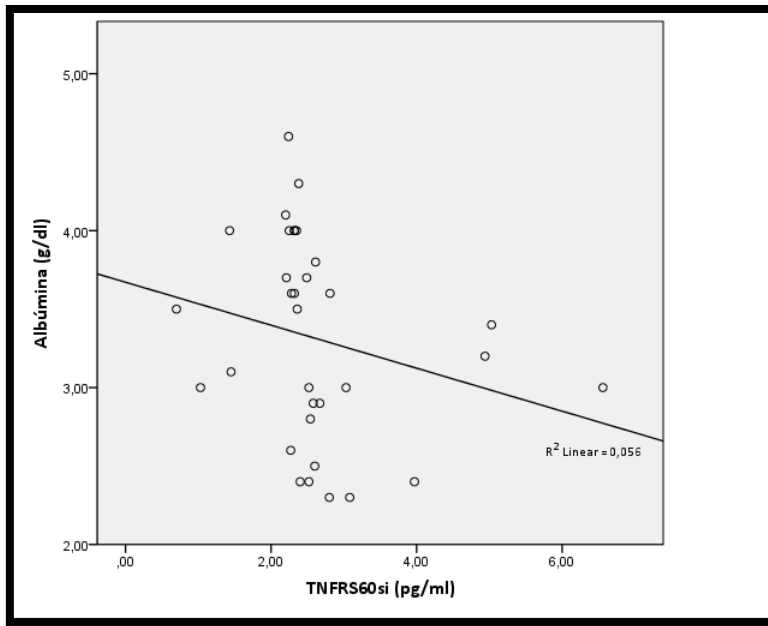
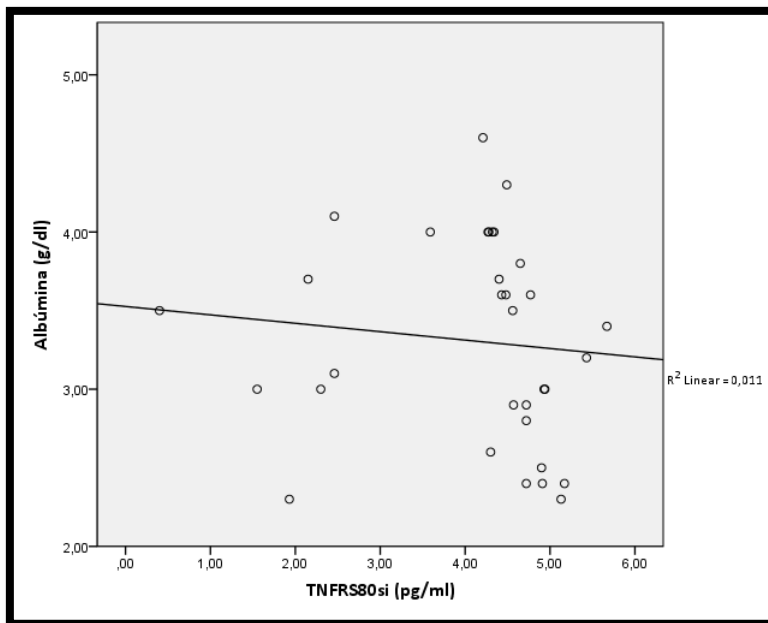


Gráfico IV-10 TNFRS80s y Albúmina (todos los pacientes)



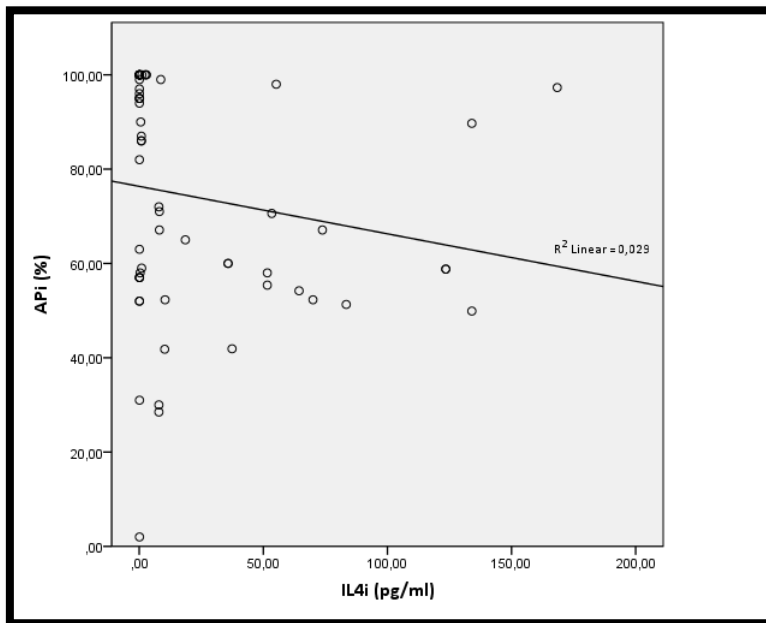
IL-4:

Los niveles de IL-4 se correlacionaron negativamente con la actividad de la protrombina ($\rho=-0,349$; $p=0,006$).

Tabla IV.13 Niveles de IL-4 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)

			Api
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	-0,349
		Sig. (bilateral)	0,006
		N	60

Gráfico IV-11 Niveles de IL-4 y Actividad de la protrombina (todos los pacientes)



Los niveles de IL-4 también se correlacionaron negativamente con los de GOT ($\rho=-0,272$; $p=0,036$), fosfatasa alcalina ($\rho=-0,266$; $p=0,046$).

Tabla IV.14 Niveles de IL-4 y de GOT y FA (todos los pacientes)

			GOT	FA
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	-0,272	-0,266
		Sig. (bilateral)	0,036	0,046
		N	60	57

Los niveles de IL-4 mostraron una correlación positiva con los de IgG ($\rho=0,345$; $p=0,011$) e IgA ($\rho=0,343$; $p=0,012$).

Tabla IV.15 Niveles de IL-4 y de IgG e IgA (todos los pacientes)

			IgG	IgA
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	0,345	0,343
		Sig. (bilateral)	0,011	0,012
		N	53	53

IL-10:

Los niveles de IL-10 se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($\rho = -0,295$; $p = 0,049$) y positivamente con los de bilirrubina ($\rho = 0,309$; $p = 0,039$).

Tabla IV.16 Niveles de IL-10 y de Albúmina y Bilirrubina (todos los pacientes)

		Albúmina	Bilirrubina
Rho de Spearman	IL10i		
		Coeficiente de correlación	-0,295
		Sig. (bilateral)	0,049
		N	45
	N	88	88

Gráfico IV-12 IL-10 y Albúmina (todos los pacientes)

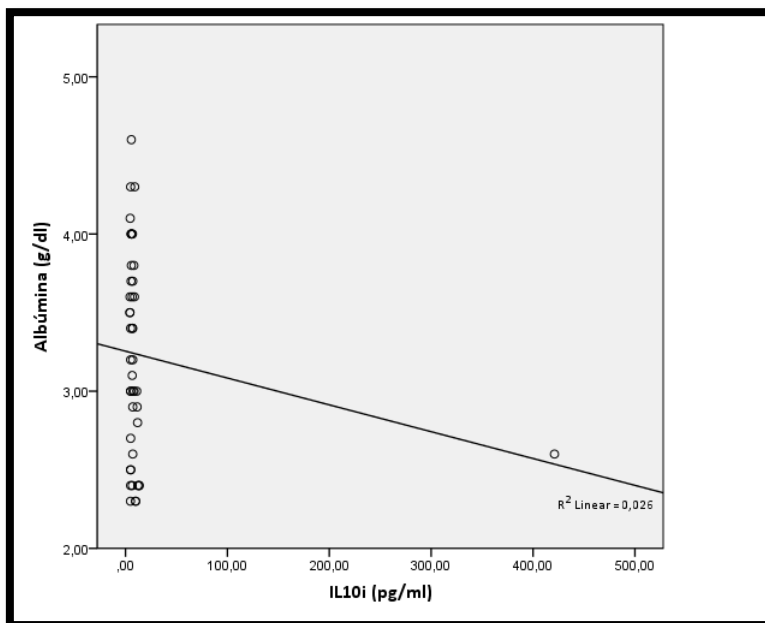
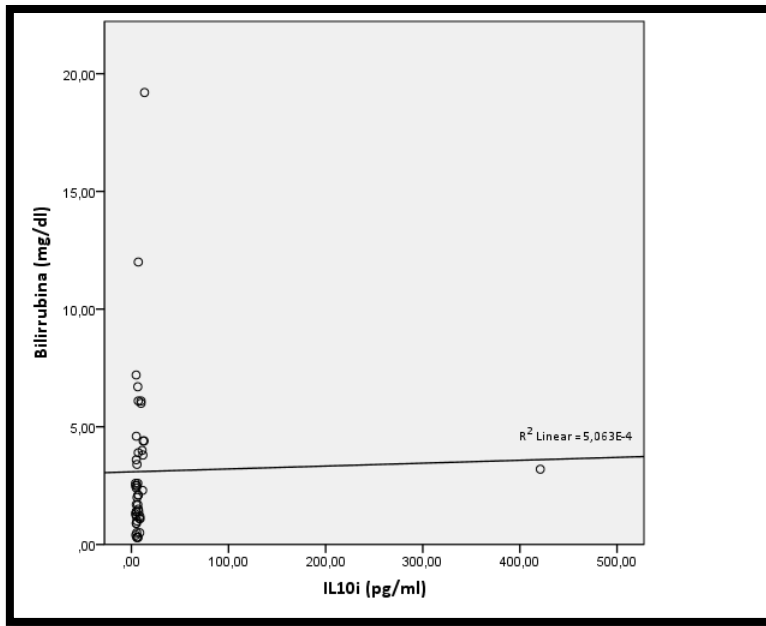


Gráfico IV-13 IL-10 y Bilirrubina (todos los pacientes)



Por último, los niveles de IL-10 se correlacionaron positivamente con los de IgG ($\rho=0,437$; $p=0,004$), IgA ($\rho=0,399$; $p=0,009$) e IgM ($\rho=0,362$; $P=0,018$).

Tabla IV.17 Niveles de IL-10 y de IgG, IgA e IgM (todos los pacientes)

		igG	igA	igM	
Rho de Spearman	il10i	Coeficiente de correlación	0,437	0,399	0,362
		Sig. (bilateral)	0,004	0,009	0,018
		N	42	42	42
		N	71	71	71

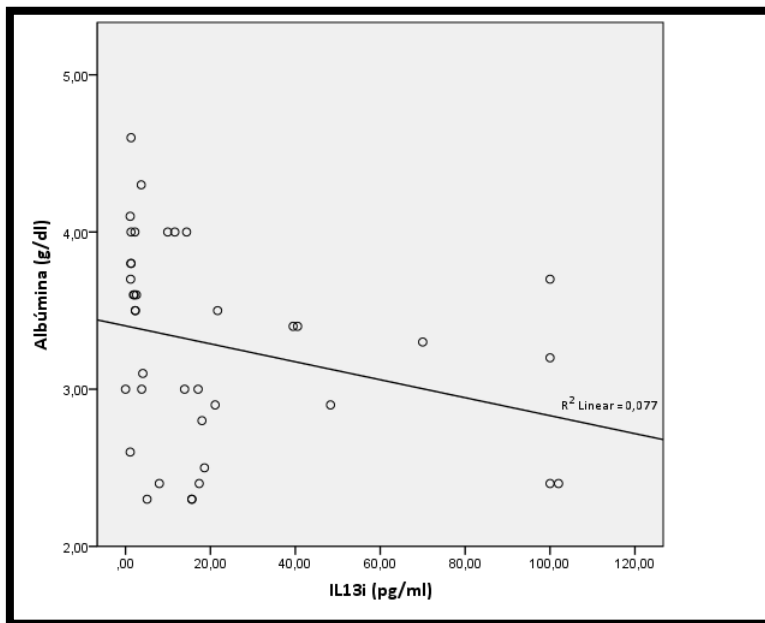
IL-13:

Los niveles de IL-13 mostraron una correlación negativa con los de albúmina ($\rho=-0,452$; $p=0,004$).

Tabla IV.18 Niveles de IL-13 y de Albúmina (todos los pacientes)

			Albúmina
Rho de Spearman	IL13i	Coefficiente de correlación	-0,452
		Sig. (bilateral)	0,004
		N	39

Gráfico IV-14 IL-13 y Albúmina (todos los pacientes)



Además, se encontró una correlación positiva entre los valores basales de IL-13 y los niveles de IgA ($\rho=0,365$; $p=0,026$).

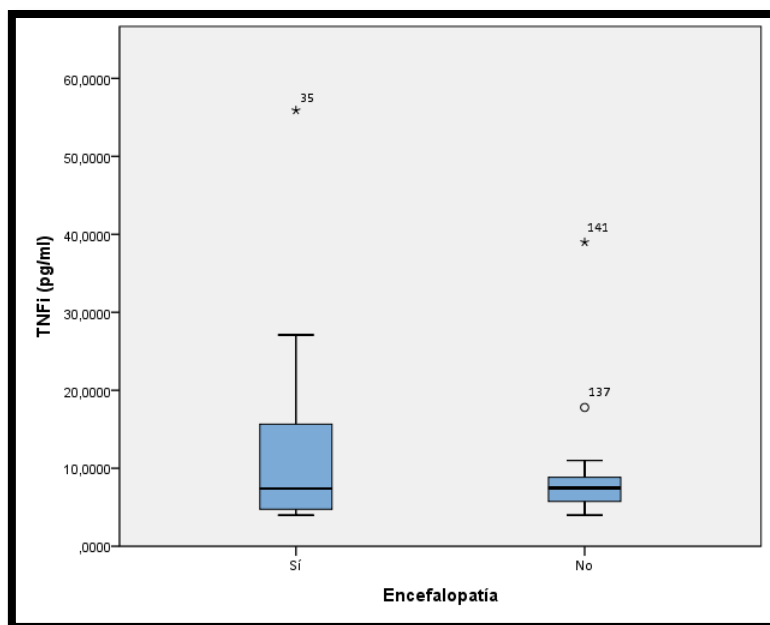
Gráfico IV-15 Niveles de IL-13 y de IgA (todos los pacientes)			
			IgA
Rho de Spearman	IL13i	Coeficiente de correlación	0,365
		Sig. (bilateral)	0,026
		N	37

2.2. Relación entre los niveles de MDA y de citoquinas y las variables de función hepática en pacientes cirróticos en el momento inicial.

TNF- α :

Los niveles de TNF- α estaban significativamente más elevados entre los individuos que tuvieron encefalopatía hepática, encontrándose una U de Mann-Whitney de 353,5, W de Wilcoxon de 1628,5 ($p=0,028$).

Gráfico IV-16 TNF y Encefalopatía hepática (cirróticos)



Además, los valores iniciales del TNF- α en cirróticos se correlacionaron positivamente con los de LDH ($\rho=0,34$; $p=0,037$) y negativamente con los fosfatasa alcalina ($\rho=-0,371$; $p=0,022$).

Tabla IV.19 Niveles de TNF y de LDH y FA (cirróticos)

		falc	ldh	
Rho de Spearman	tnfa	Coeficiente de correlación	-371	,340
		Sig. (bilateral)	,022	,037
		N	38	38

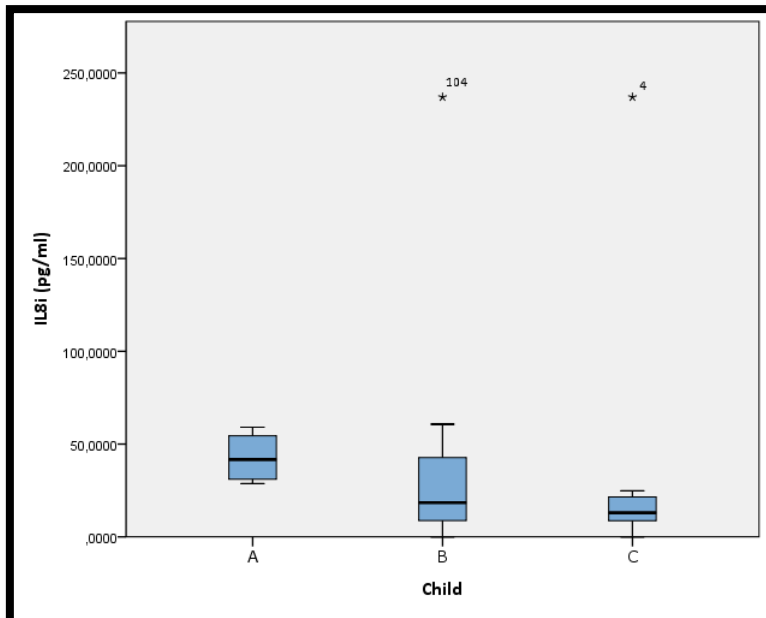
Por último, los niveles de TNF- α se correlacionaron negativamente con los de IgM ($r=-0,34$; $p=0,049$).

		IgM
TNFi	Correlación de Pearson	-0,340
	Sig. (bilateral)	0,049
	N	34

IL-8:

Los niveles basales de IL-8 se relacionaron negativamente con la gravedad en la escala de Child-Pugh, con concentraciones más elevadas para los que se encontraban en la categoría A ($\chi^2=6,367$; $p=0,041$).

Gráfico IV-17 IL-8 y Escala de Child-Pugh (cirróticos)



Además, los niveles de IL-8 se correlacionaron positivamente con los de GOT ($\rho=0,645$; $p < 0,001$), GPT ($\rho=0,453$; $p=0,008$) y LDH ($\rho=0,358$; $p=0,048$).

Tabla IV.21 Niveles de IL-8 y de GOT, GPT y LDH (cirróticos)

			GOT	GPT	LDH
Rho de Spearman	IL8i	Coefficiente de correlación	0,645	0,453	0,358
		Sig. (bilateral)	<0,001	0,008	0,048
		N	33	33	31

Por último, los niveles de IL-8 se correlacionaron negativamente con los de IgA ($\rho=-0,382$; $p=0,037$).

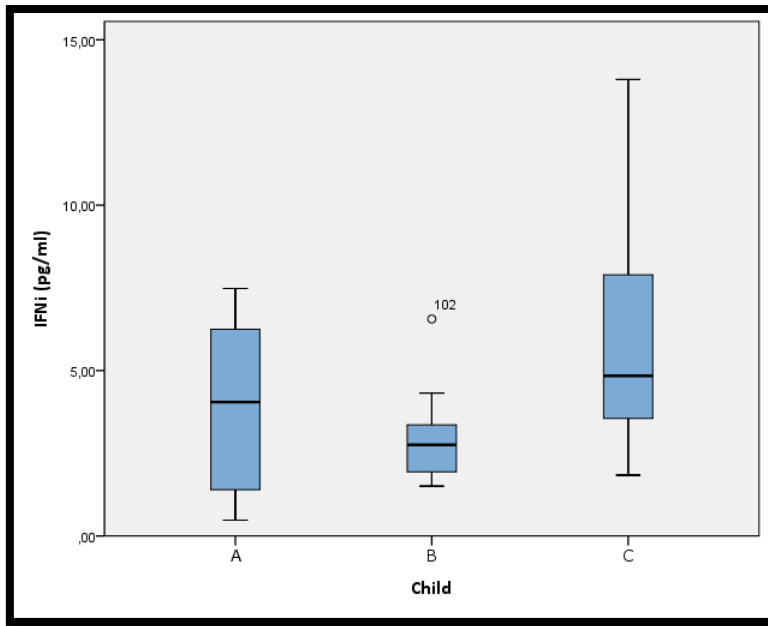
Tabla IV.22 Niveles de IL-8 y de IgA (cirróticos)

			IgA
Rho de Spearman	IL8i	Coefficiente de correlación	-0,382
		Sig. (bilateral)	0,037
		N	30

IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ se relacionaron negativamente con la gravedad en la escala de Child ($X^2=7,146$; $p=0,028$).

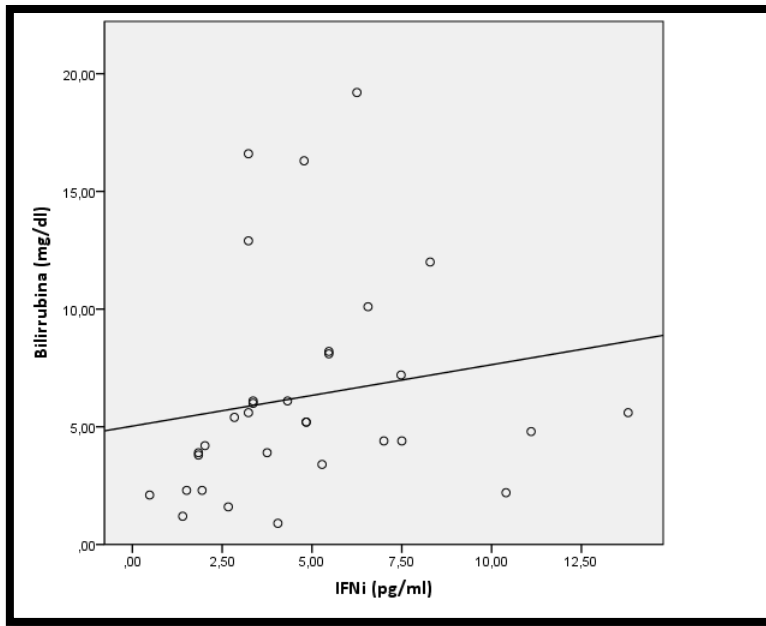
Gráfico IV-18 IFN y Escala de Child-Pugh (cirróticos)



Además, los niveles de IFN- γ se correlacionaron positivamente con los de bilirrubina ($p=0,404$; $p=0,022$).

			Bilirrubina
Rho de Spearman	ifng1	Coefficiente de correlación	0,404
		Sig. (bilateral)	0,022
		N	32

Gráfico IV-19 IFN y Bilirrubina (cirróticos)



Por último, los niveles de IFN- γ se correlacionaron positivamente con los de IgA ($p=0,379$; $p=0,047$).

Gráfico IV-20 Niveles de IFN y de IgA (cirróticos)

			IgA
Rho de Spearman	ifng1	Coefficiente de correlación	0,379
		Sig. (bilateral)	0,047
		N	28

TNFRS 1 y 2:

Los niveles de ambos receptores solubles del TNF α se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($\rho=-0,54$; $p=0,046$ y $\rho=-0,66$; $p=0,01$ para TNFRs60 y TNFRs80 respectivamente).

Tabla IV.24 Niveles de TNFRS60s y TNFRS80s y Albúmina (cirróticos)

			Albúmina
Rho de Spearman	TNFRS60si	Coefficiente de correlación	-0,540
		Sig. (bilateral)	0,046
		N	14
	TNFRS80si	Coefficiente de correlación	-0,660
		Sig. (bilateral)	0,010
		N	14

Gráfico IV-21 TNFRS60s y Albúmina (cirróticos)

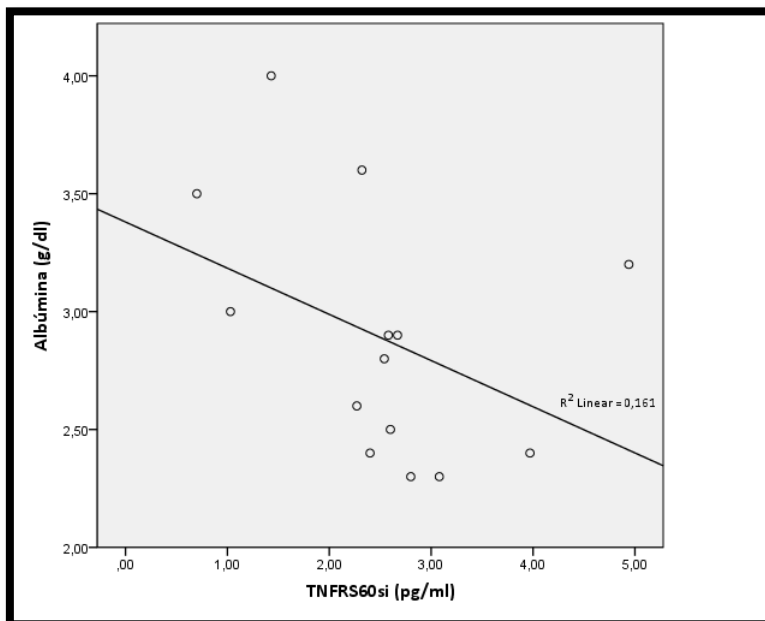
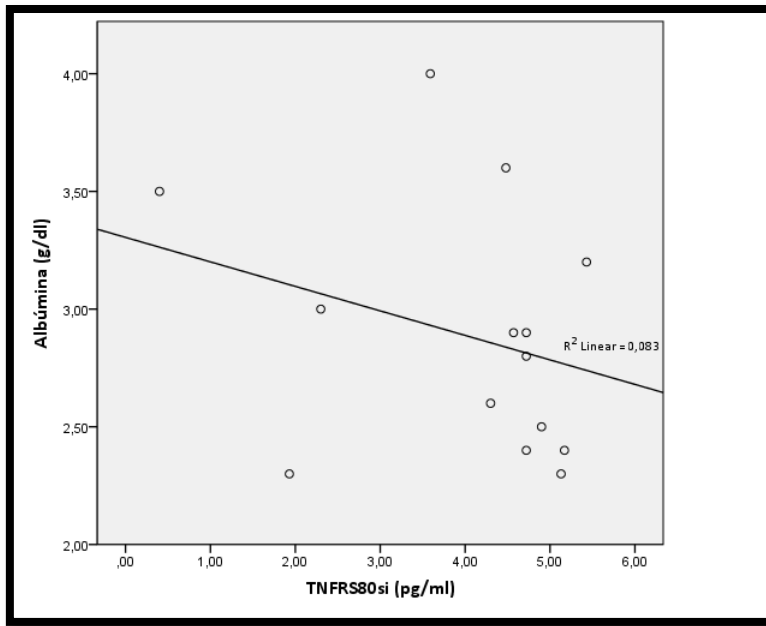
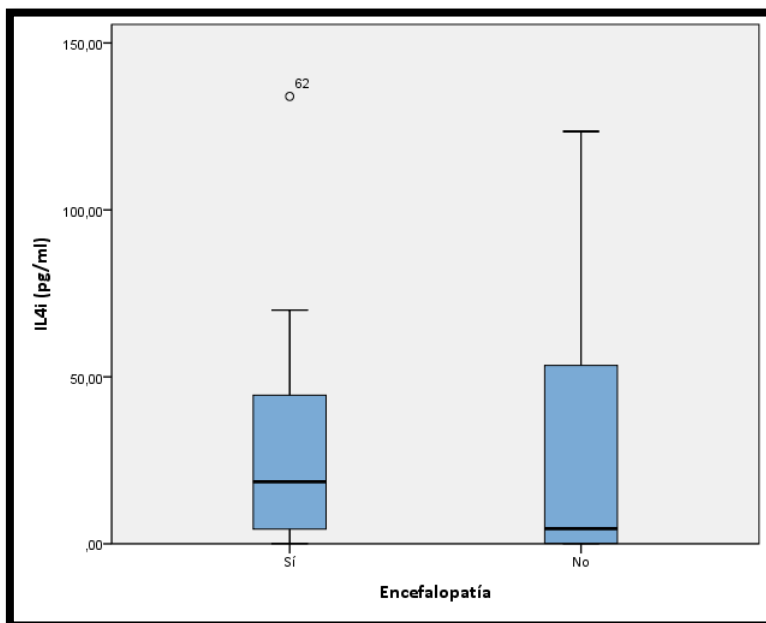


Gráfico IV-22 TNFRS80s y Albúmina (cirróticos)



IL-4:

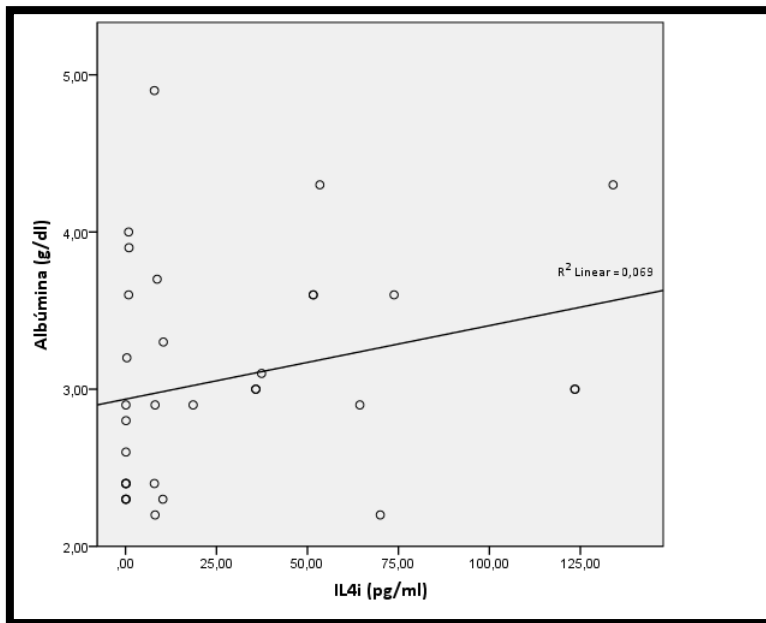
Se encontró una fuerte tendencia a una relación entre los niveles basales de IL-4 en cirróticos y la presencia de encefalopatía (U=227; W=1262; p=0,056).



Además, los niveles de IL-4 se correlacionaron significativamente con los de albúmina ($\rho=0,414$; $p=0,017$).

			Albúmina
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	0,414
		Sig. (bilateral)	0,017
		N	33

Gráfico IV-23 IL-4 y Albúmina (cirróticos)



Por último, se encontró una correlación negativa entre los niveles de IL-4 y los de GOT ($\rho=-0,509$; $p=0,002$) y fosfatasa alcalina ($\rho=-0,635$; $p< 0,001$).

			GOT	FA
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	-0,509	-0,635
		Sig. (bilateral)	0,002	< 0,001
		N	33	31

IL-10:

Los niveles de IL-10 se correlacionaron positivamente con los de IgM ($\rho=0,495$; $p= 0,037$).

			IgM
Rho de Spearman	IL10i	Coefficiente de correlación	0,495
		Sig. (bilateral)	0,037
		N	18

IL-13:

Los niveles de IL-13 se correlacionaron negativamente con los de GPT ($\rho=-0,545$; $p=0,024$) y de fosfatasa alcalina ($\rho=-0,648$; $p=0,007$).

			GPT	FA
Rho de Spearman	IL13i	Coefficiente de correlación	-0,545	-0,648
		Sig. (bilateral)	0,024	0,007
		N	17	16

2.3. Relación entre los niveles de MDA y de citoquinas y las variables de función hepática en pacientes no cirróticos en el momento inicial.

MDA:

Los niveles de MDA se correlacionaron positivamente con los niveles de GPT ($\rho=0,706$; $p=0,005$). También hallamos una tendencia hacia la correlación positiva entre éstos y los niveles de GOT y de LDH.

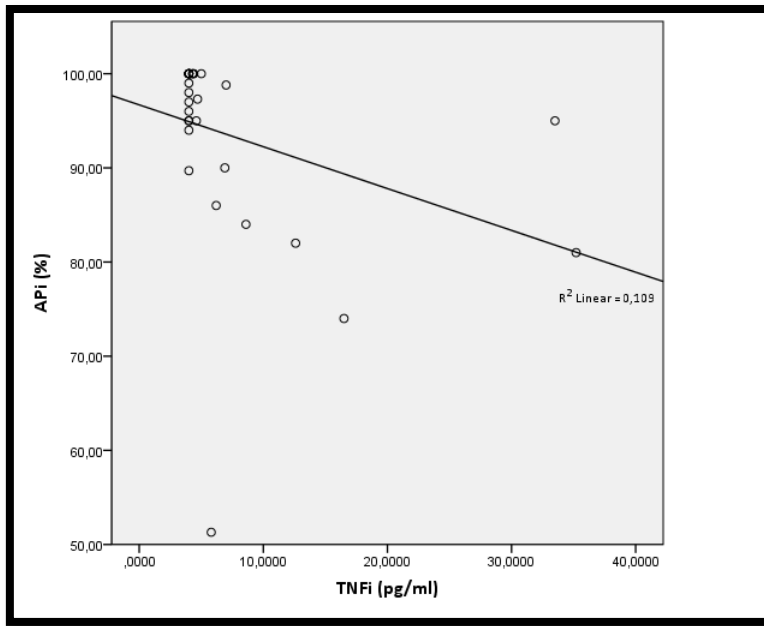
			GOT	GPT	LDH
Rho de Spearman	MDAi	Coeficiente de correlación	0,473	0,706	0,527
		Sig. (bilateral)	0,088	0,005	0,064
		N	14	14	13

TNF- α :

Encontramos que los niveles de TNF- α se correlacionaron negativamente con la actividad de la protrombina ($\rho=-0,553$; $p=0,001$) y presentaron una tendencia a la correlación negativa con los niveles de albúmina.

			AP	Albúmina
Rho de Spearman	TNFi	Coeficiente de correlación	-0,553	-0,343
		Sig. (bilateral)	0,001	0,059
		N	31	31

Gráfico IV-24 TNF y Actividad de la protrombina (no cirróticos)



IL-6:

Los niveles de IL-6 se correlacionaron negativamente con la cifra de plaquetas ($p=-0,371$; $p=0,043$). No se encontraron correlaciones entre los valores de esta citoquina con los parámetros de función hepática evaluados en pacientes nocirróticos.

Tabla IV.31 Niveles de IL-6 y Plaquetas (no cirróticos)

			Plaquetas
Rho de Spearman	IL6i	Coefficiente de correlación	-0,371
		Sig. (bilateral)	0,043
		N	30

IL-8:

Los niveles de IL-8 se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($\rho = -0,399$; $p = 0,032$) y con la actividad de la protrombina ($\rho = -0,625$; $p < 0,001$).

Tabla IV.32 Niveles de IL-8 y función hepática (no cirróticos)

			Albúmina	APi
Rho de Spearman	IL8i	Coeficiente de correlación	-0,399	-0,625
		Sig. (bilateral)	0,032	< 0,001
		N	29	29

Gráfico IV-25 IL-8 y Albúmina (no cirróticos)

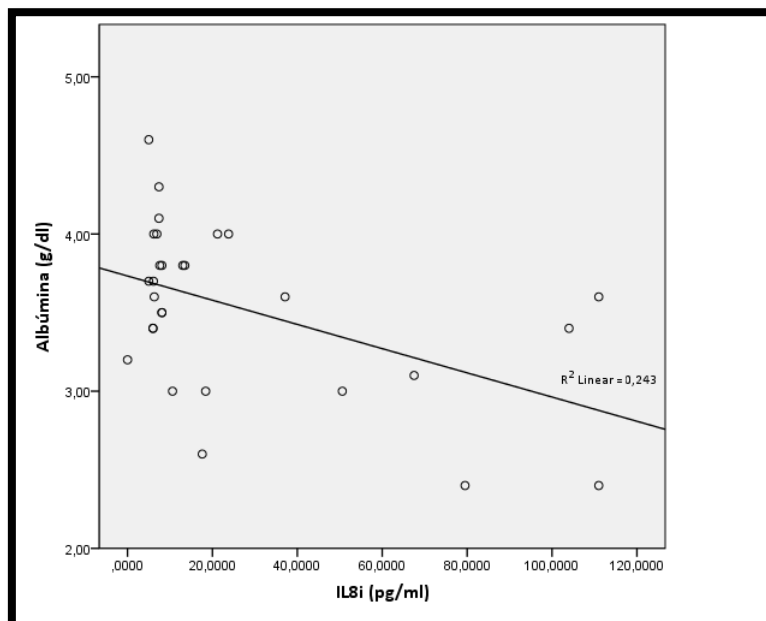
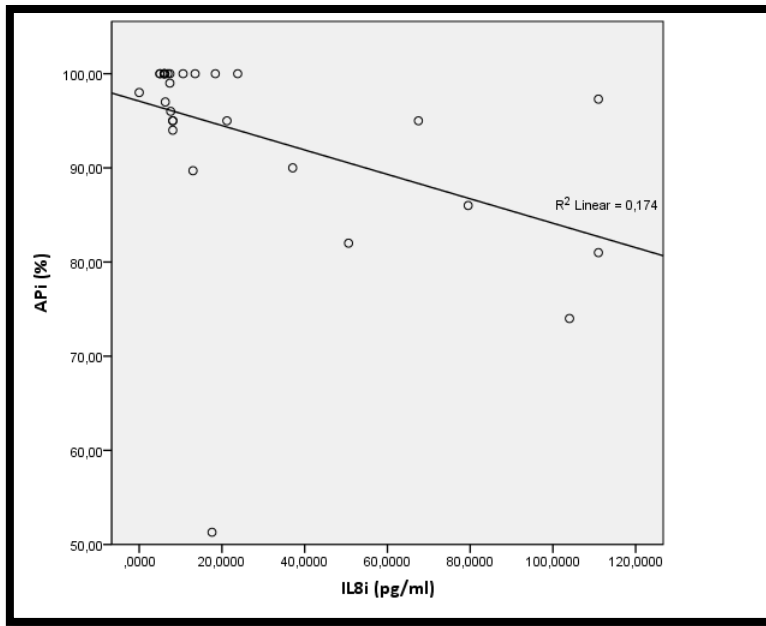


Gráfico IV-26 IL-8 y Actividad de la protrombina (no cirróticos)



También se halló una correlación negativa entre la concentración de IL-8 y la cifra de plaquetas ($\rho=-038$; $p=0,046$).

Tabla IV.33 Niveles de IL-8 y Plaquetas (no cirróticos)

		Plaquetas	
Rho de Spearman	IL8i	Coefficiente de correlación	-0,380
		Sig. (bilateral)	0,046
		N	28

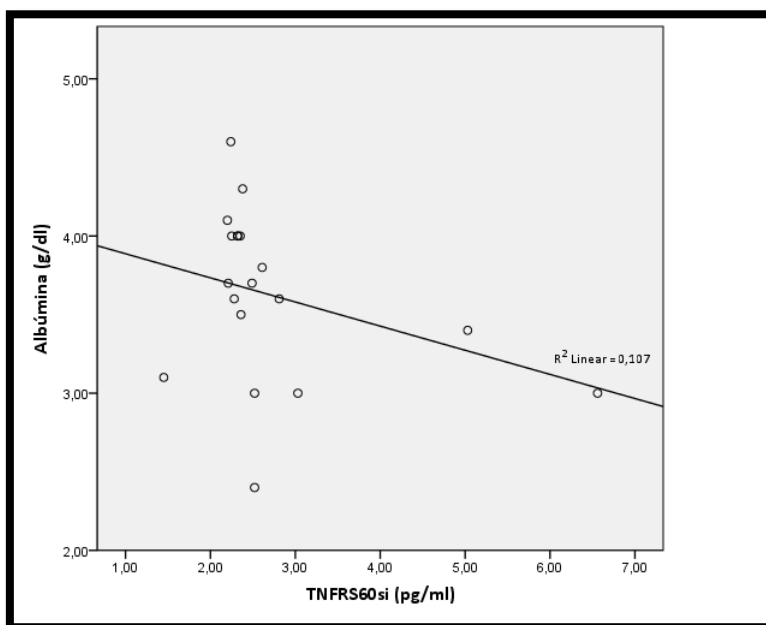
TNFRS 1 y 2:

Los niveles de TNFRS60s se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($\rho=-0,534$; $P=0,019$) y con los de fosfatasa alcalina ($\rho=-0,639$; $p=0,003$).

Tabla IV.34 Niveles de TNFRS60s y de Albúmina y FA (no cirróticos)

		Albúmina	FA
Rho de Spearman	TNFRS60si	Coefficiente de correlación	-0,534
		Sig. (bilateral)	0,019
		N	19

Gráfico IV-27 TNFRS60s y Albúmina (no cirróticos)

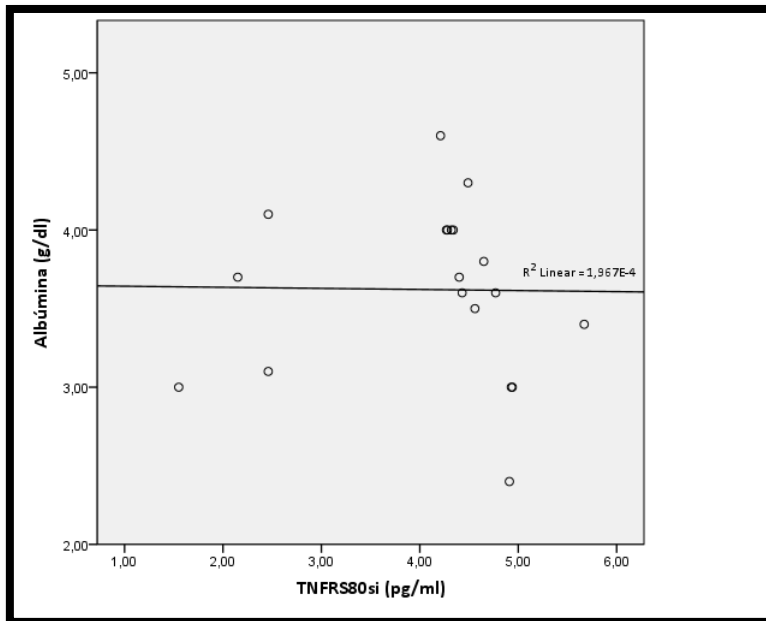


Los niveles de TNFRS80s también se correlacionaron negativamente con los de albúmina ($r=-0,525$; $p=0,021$).

Tabla IV.35 Niveles de TNFRS80s y de Albúmina (no cirróticos)

		Albúmina
TNFRS80si	Correlación de Pearson	-0,525
	Sig. (bilateral)	0,021
	N	19

Gráfico IV-28 TNFRS80s y Albúmina (no cirróticos)

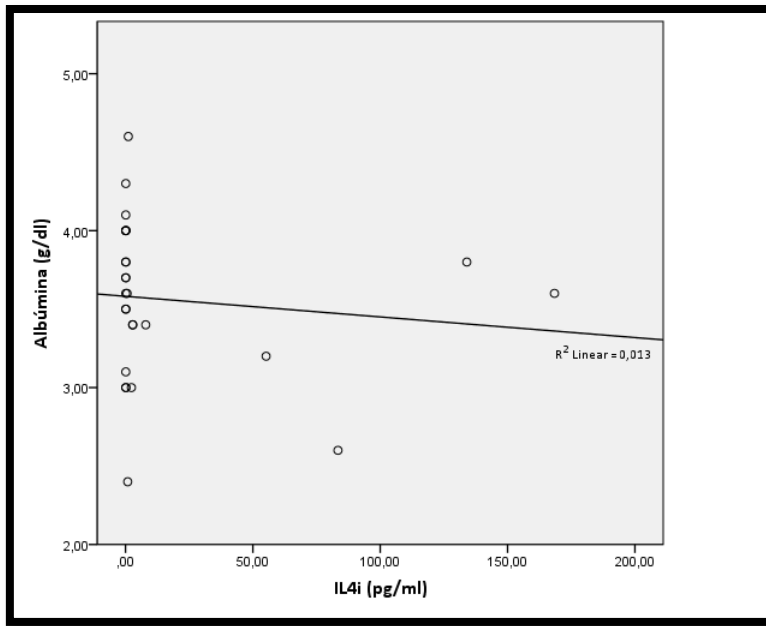


IL-4:

Sólo encontramos relación entre esta citoquina y los niveles de albúmina en estos pacientes y dicha correlación fue negativa ($\rho=-0,418$; $p=0,03$).

			Albúmina
Rho de Spearman	IL4i	Coefficiente de correlación	-0,418
		Sig. (bilateral)	0,030
		N	27

Gráfico IV-29 IL-4 y Albúmina (no cirróticos)



3. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial.

3.1. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial en pacientes cirróticos y no cirróticos.

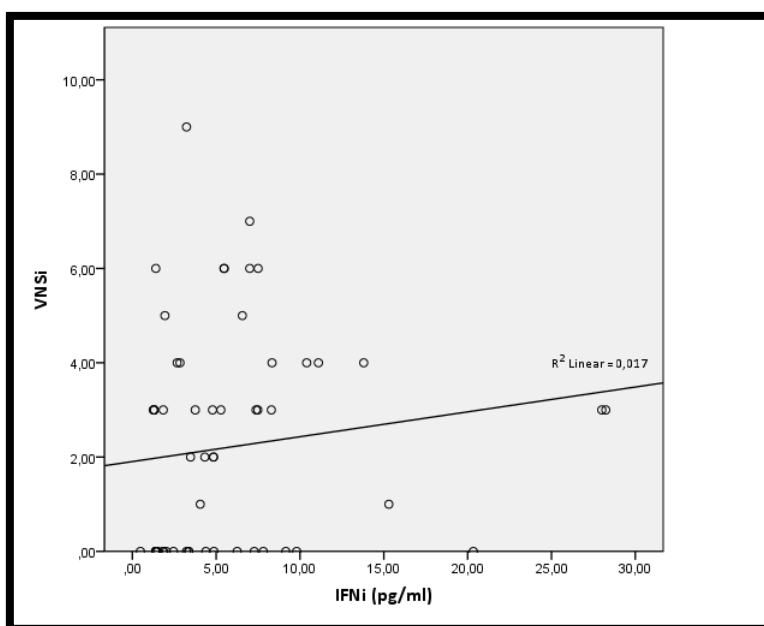
IFN-γ:

Los niveles de IFN-γ se correlacionaron positivamente con la valoración nutricional subjetiva ($\rho=0,28$; $p=0,035$).

Tabla IV.37 Niveles de IFN y VNS (todos los pacientes)

			VNS
Rho de Spearman	IFNi	Coeficiente de correlación	0,280
		Sig. (bilateral)	0,035
		N	57

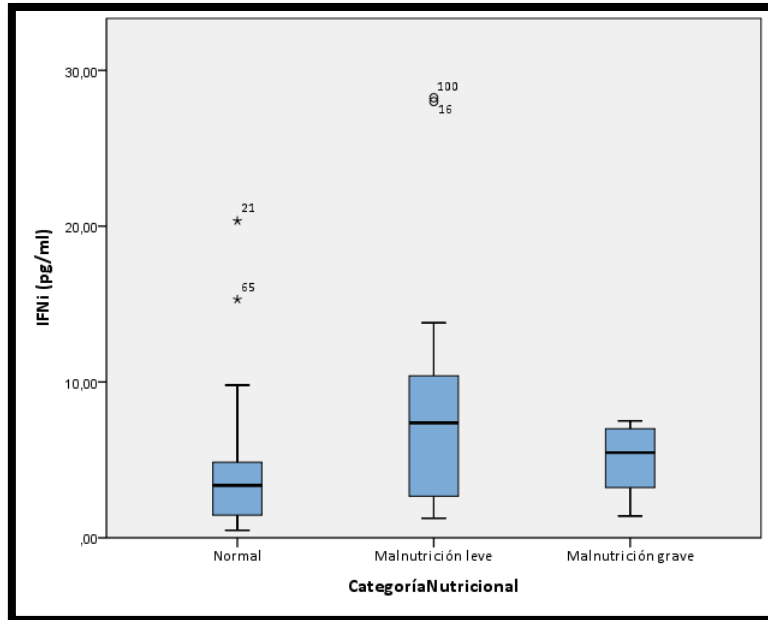
Gráfico IV-30 IFN y VNS (todos los pacientes)



Los niveles de IFN- γ también se relacionaron con la categoría nutricional

($X^2=6,278$; $p=0,043$).

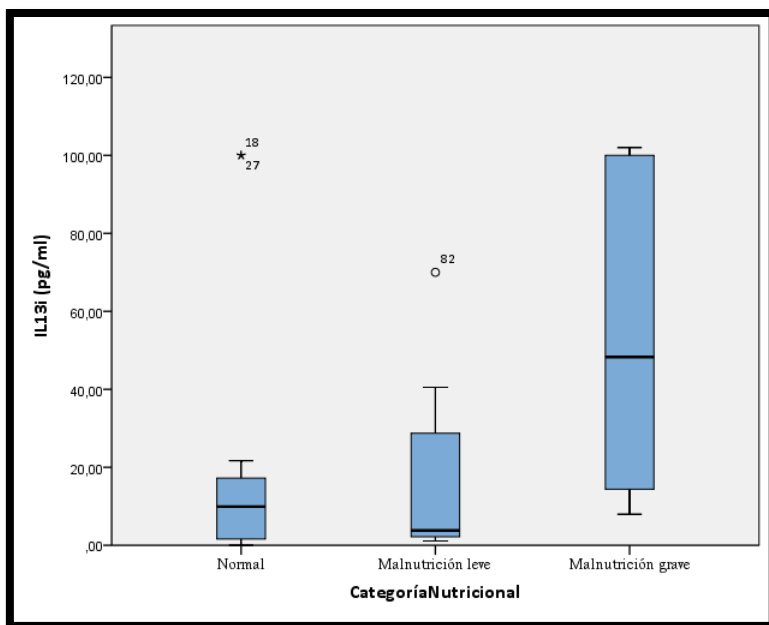
Gráfico IV-31 IFN y Categoría Nutricional (todos los pacientes)



IL-13:

Los niveles de IL-13 se relacionaron con la categoría nutricional ($X^2=6,307$; $p=0,043$).

Gráfico IV-32 IL-13 y Categoría Nutricional (todos los pacientes)



3.2. Niveles de MDA y citoquinas y estado nutricional en el momento inicial en pacientes cirróticos.

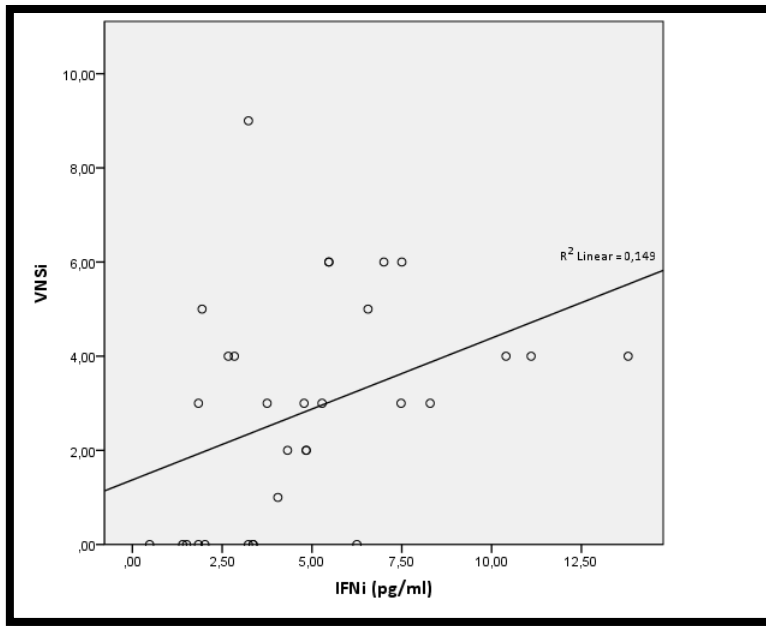
IFN-γ:

Los niveles de IFN-γ se correlacionaron positivamente con la valoración nutricional subjetiva ($r=0,386$; $p=0,032$).

Tabla IV.38 Niveles de IFN y VNS (cirróticos)

		VNS
IFNi	Correlación de Pearson	0,386
	Sig. (bilateral)	0,032
	N	31

Gráfico IV-33 IFN y VNS (cirróticos)



IL-13:

Los niveles de IL-13 tendieron a relacionarse positivamente con la categoría nutricional ($\chi^2=4,788$; $p=0,091$).

3.3. Estado nutricional y niveles de MDA y citoquinas en el momento inicial en pacientes no cirróticos.

No se encontró relación alguna entre las concentraciones plasmáticas de citoquinas y MDA y el estado nutricional en alcohólicos no cirróticos. Sólo los niveles de IL-13 tendieron a relacionarse con la categoría nutricional ($\chi^2=4,78$; $p=0,09$).

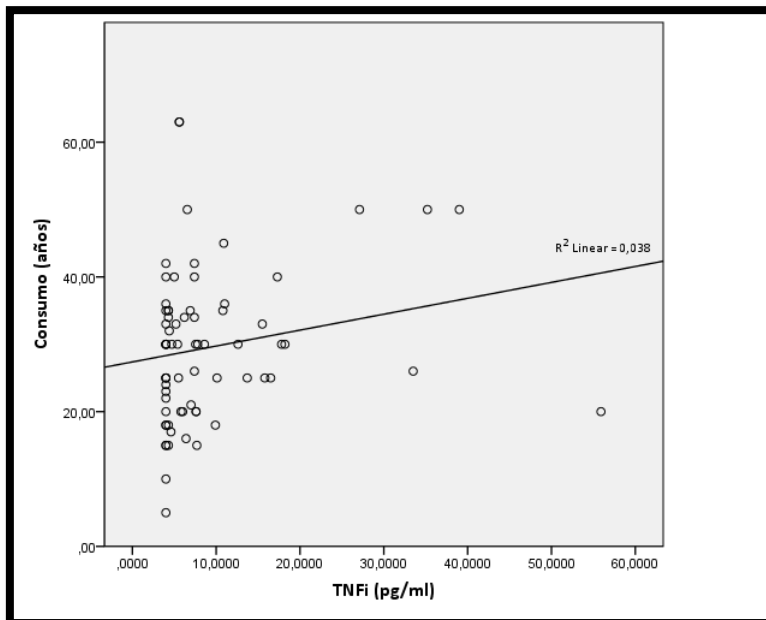
4. Niveles de MDA y citoquinas en el momento inicial y consumo de alcohol.

4.1. Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes cirróticos y no cirróticos en el momento inicial.

TNF- α :

Los niveles de TNF- α se correlacionaron positivamente con el tiempo de consumo ($\rho=-0,245$; $p=0,039$).

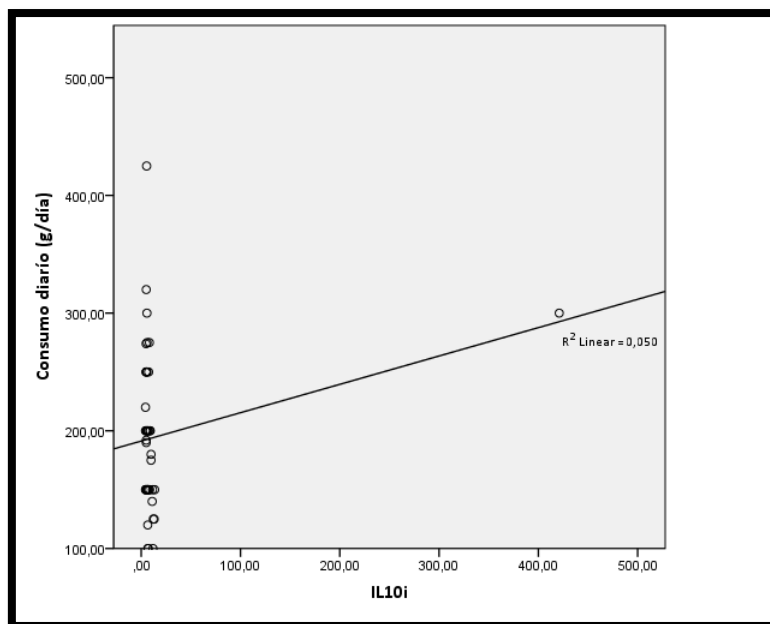
Gráfico IV-34 TNF y tiempo de consumo (todos los pacientes)



IL-10:

Se encontró una correlación negativa entre los niveles de IL-10 y el consumo diario de alcohol ($\rho=-0,341$; $p=0,022$).

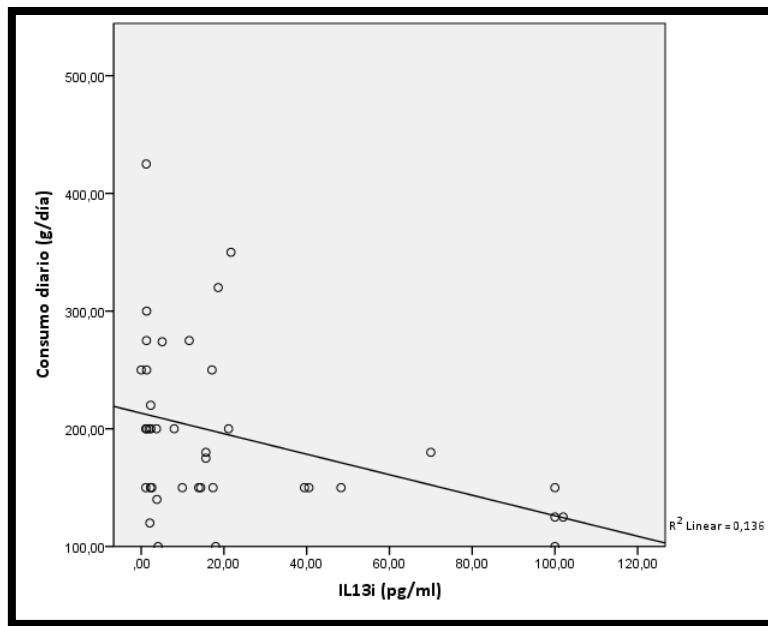
Gráfico IV-35 IL-10 y consumo diario (todos los pacientes)



IL-13:

Los niveles de IL-13 también mostraron una correlación negativa con el consumo diario ($\rho=-0,395$; $p=0,013$).

Gráfico IV-36 IL-13 y consumo diario (todos los pacientes)



4.2 Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes cirróticos en el momento inicial.

Cuando estudiamos la relación entre consumo de alcohol y citoquinas y variables de peroxidación lipídica sólo encontramos relaciones significativas para los receptores solubles del TNF- α y la IL-10 con respecto al consumo diario ($r=-0,622$ y $p=0,018$; $r=-0,615$ y $p=0,019$; $\rho=-0,523$; $p=0,018$ para el TNFRS60s, el TNFRS80s y la IL-10 respectivamente).

Gráfico IV-37 TNFRS60s y consumo diario (cirróticos)

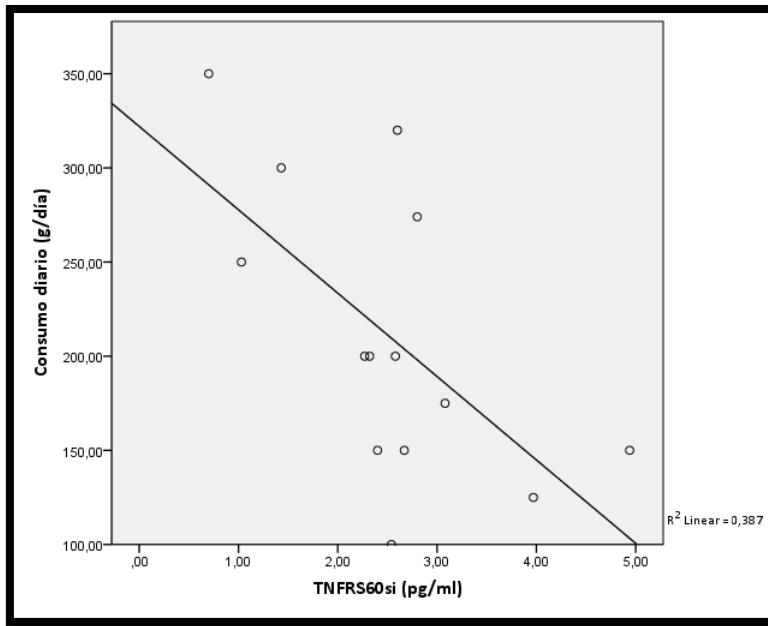
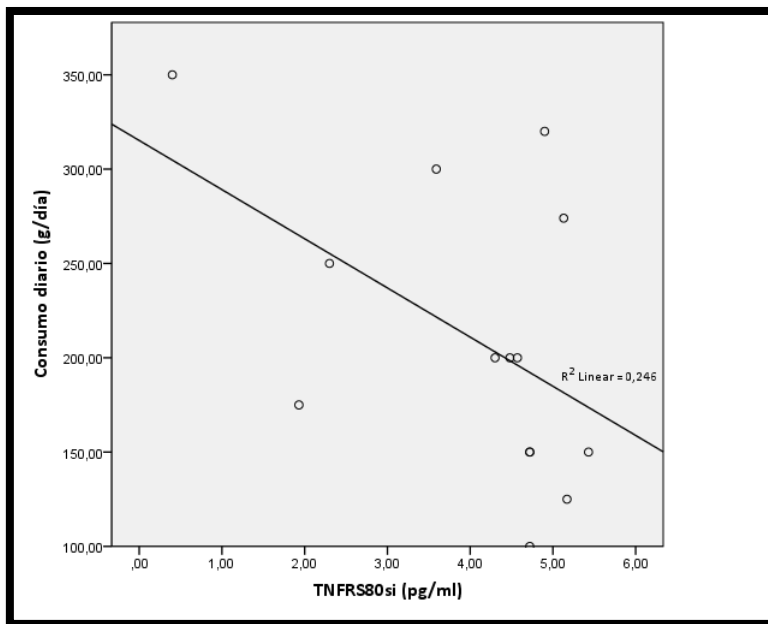


Gráfico IV-38 TNFRS80s y consumo diario (cirróticos)

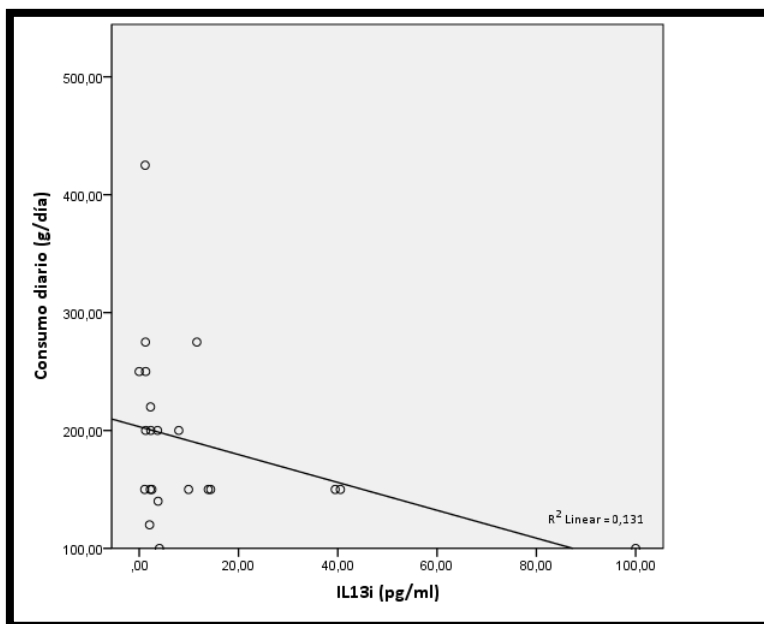


4.3. Niveles de MDA y de citoquinas y consumo de alcohol en pacientes no cirróticos en el momento inicial.

IL-13:

Sólo encontramos que las concentraciones de IL-13 se correlacionaron negativamente con el consumo diario de alcohol ($\rho=-0,487$; $p=0,022$).

Gráfico IV-39 IL-13 y consumo diario (no cirróticos)



5. Mortalidad inicial y niveles iniciales de MDA y de citoquinas.

Mortalidad:

Durante el período de seguimiento del estudio fallecen 36 pacientes, lo que supone una mortalidad global elevada (41,37%). De los pacientes que fallecieron, 26 eran cirróticos, lo que implica una mortalidad de 53,06% en este subgrupo.

Tabla IV.39 Mortalidad

Grupo de Estudio	Nº total	Nº de eventos	Mortalidad
Cirróticos	49	26	53%
No Cirróticos	38	10	26,31%
Global	87	36	41,37%

5.1. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas con la mortalidad en todos los pacientes (cirróticos y no cirróticos).

IL-6:

Los niveles de IL-6 iniciales presentaron una tendencia a correlacionarse con la mortalidad, mayor para las cifras más elevadas. Esta tendencia se tornaba significativa al comparar valores iguales o inferiores a la mediana con respecto a valores superiores, apareciendo una mayor mortalidad para este último grupo.

Tabla IV.40 Supervivencia e IL-6

		X ²	gl	Sig.		X ²	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	IL6i(Q ₁₋₄)	5,976	3	0,113	IL6i(Mediana)	6,396	1	0,011
Breslow (Generalized Wilcoxon)		6,707	3	0,082		5,956	1	0,015

Gráfico IV-40 Curva de Kaplan-Meier para IL-6 (cuartiles, todos los pacientes)

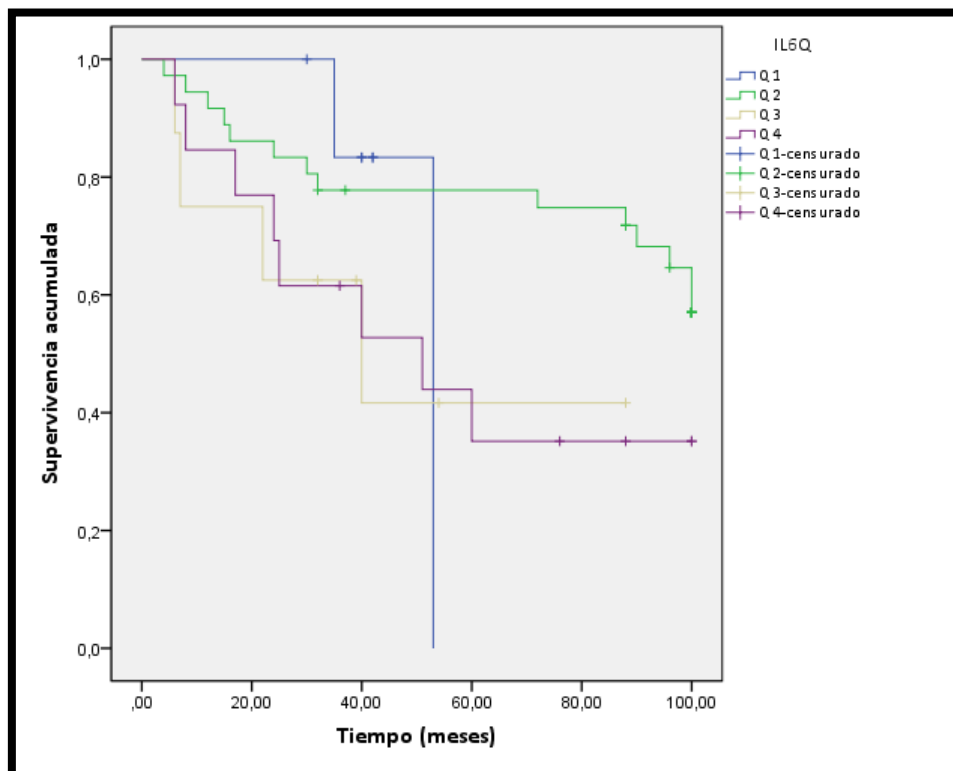
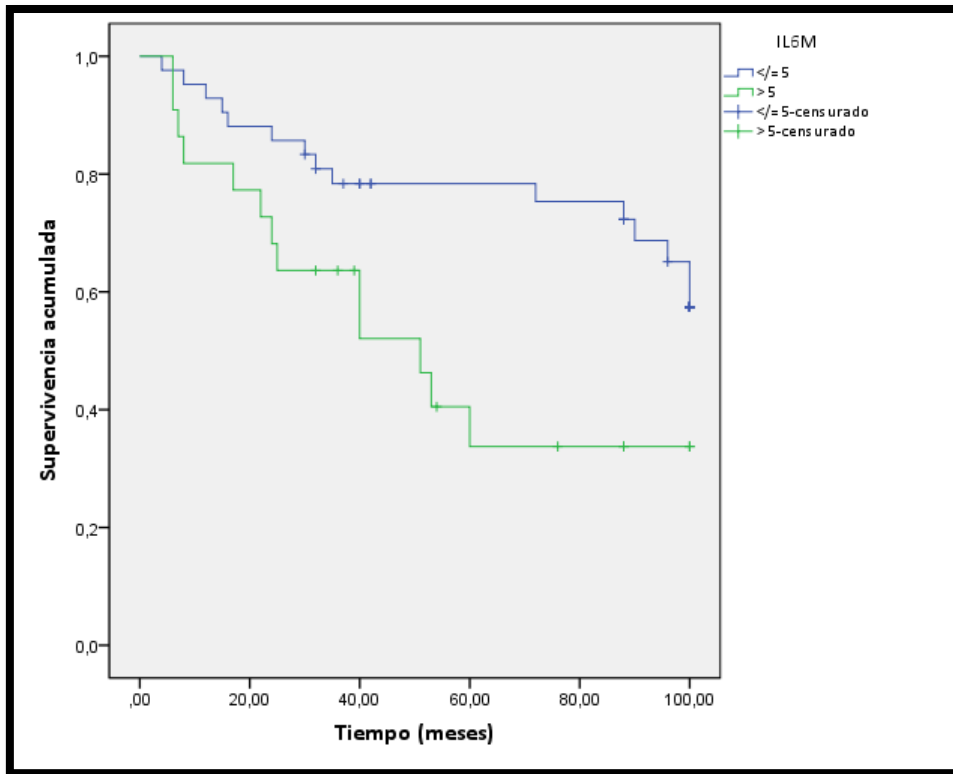


Gráfico IV-41 Curva de Kaplan-Meier para IL-6 (mediana, todos los pacientes)

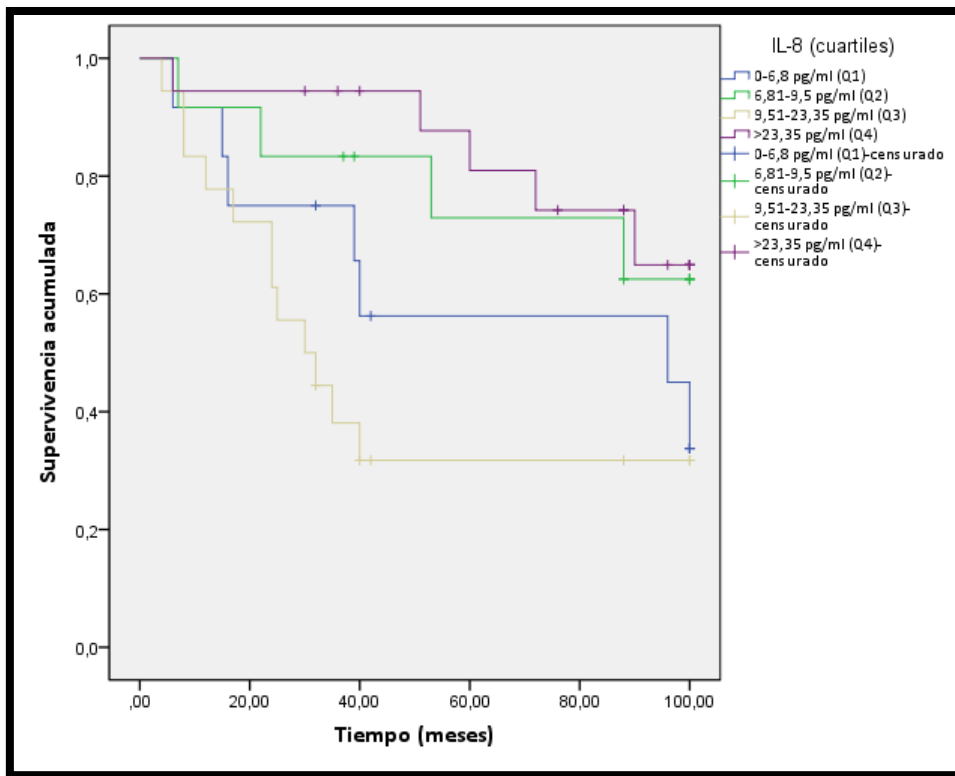


IL-8:

Los niveles iniciales de IL-8 no se correlacionaron directamente con la mortalidad, si bien se encontró que ésta estaba significativamente más aumentada entre aquellos pacientes con concentraciones basales comprendidas entre 9,5 pg/ml y 23,35 pg/ml (correspondientes al tercer cuartil).

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,741	3	0,013
Breslow (Generalized Wilcoxon)	11,924	3	0,008

Gráfico IV-42 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (cuartiles, todos los pacientes)



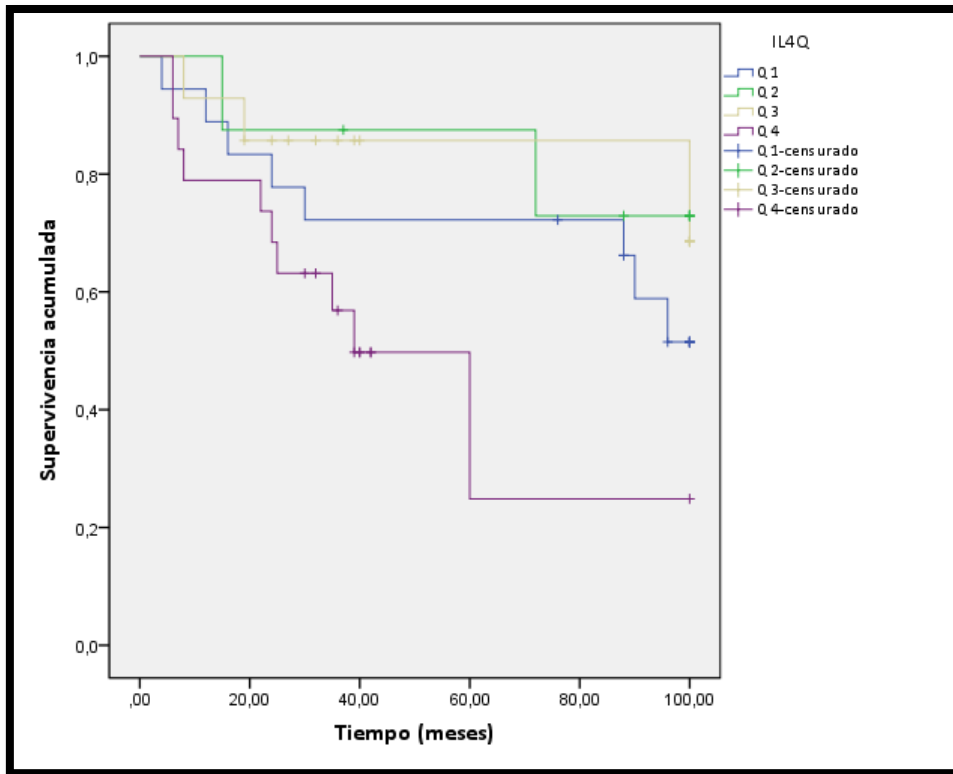
IL-4:

Los niveles iniciales de IL-4 presentaron una tendencia a relacionarse con la mortalidad, siendo mayor en los niveles más elevados.

Tabla IV.42 Supervivencia e IL-4 (cuartiles, todos los pacientes)

	X ²	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,502	3	0,090
Breslow (Generalized Wilcoxon)	5,358	3	0,147

Gráfico IV-43 Curva de Kaplan-Meier para IL-4 (cuartiles, todos los pacientes)

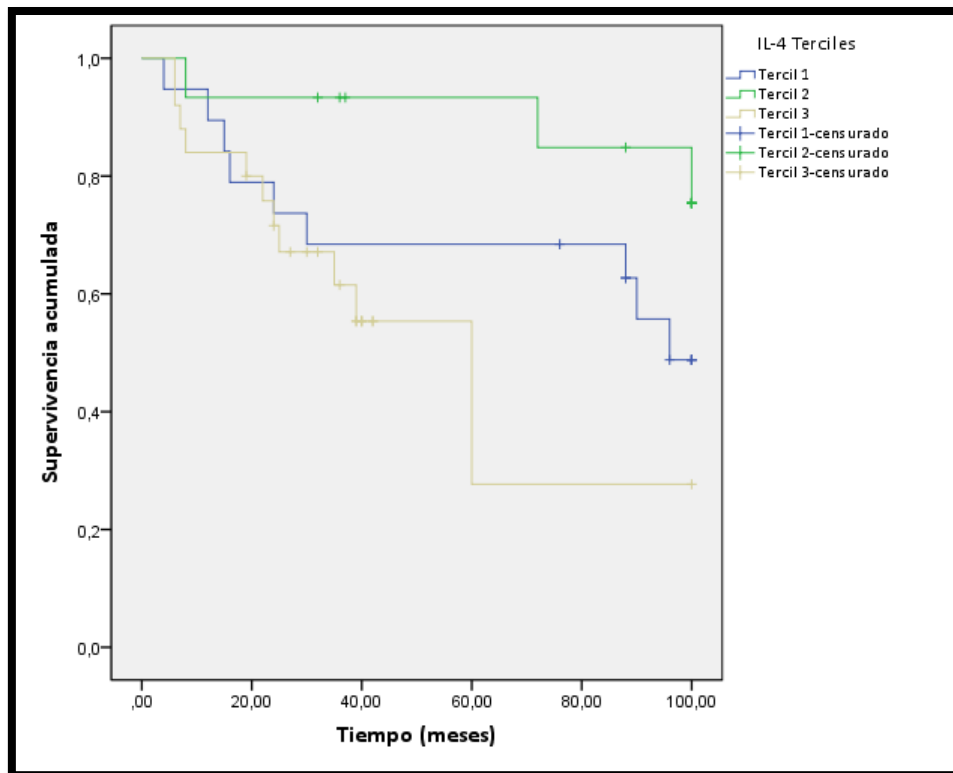


Dicha tendencia se acentuaba al considerar los niveles de IL-4 en terciles.

Tabla IV.43 Supervivencia e IL-4 (terciles, todos los pacientes)

	X ²	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,827	2	0,054
Breslow (Generalized Wilcoxon)	5,051	2	0,080

Gráfico IV-44 Curva de Kaplan-Meier para IL-4 (terciles, todos los pacientes)



Al analizar el resto de las variables estudiadas no se encontró relación alguna entre las concentraciones iniciales de MDA, TNF- α , IFN- γ y de ambos receptores solubles del TNF- α con la mortalidad. Finalmente, tampoco se encontró relación entre los valores iniciales de IL-10 e IL-13 y la mortalidad entre todos los pacientes.

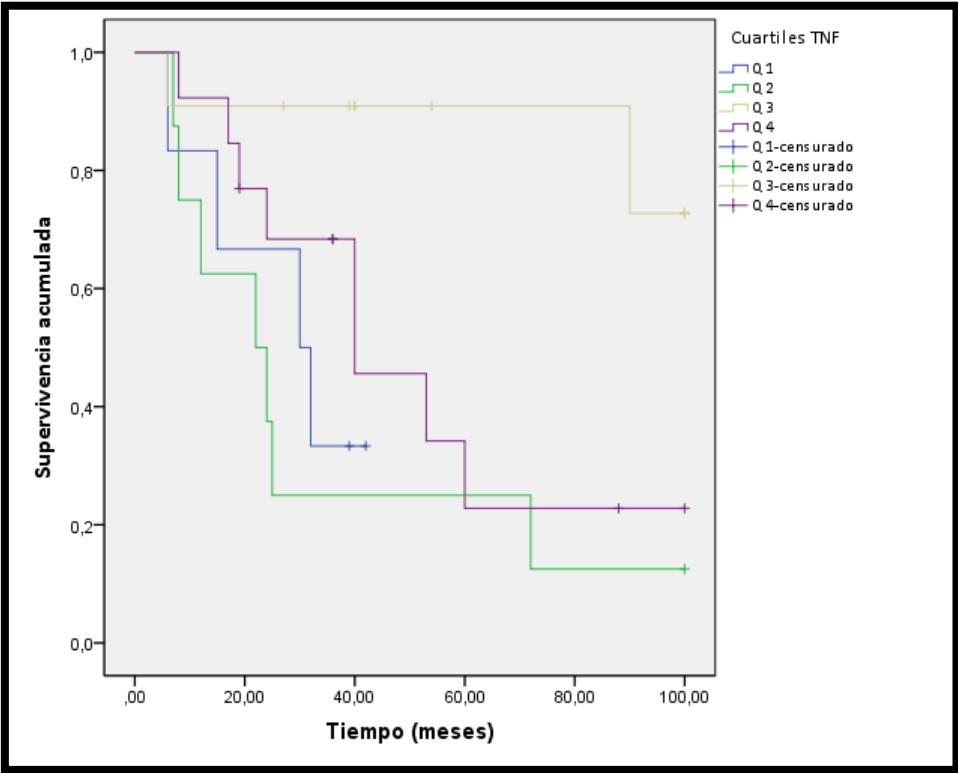
5.2. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas con la mortalidad en los pacientes cirróticos.

TNF- α :

Entre los pacientes cirróticos, los niveles de TNF- α situados en el tercer cuartil de su distribución se relacionaron con una mortalidad significativamente menor que todos los demás rangos de valor de esta citoquina.

Tabla IV.44 Supervivencia y TNF (cuartiles, sólo cirróticos)			
	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,262	3	0,016
Breslow (Generalized Wilcoxon)	9,106	3	0,028

Gráfico IV-45 Curva de Kaplan-Meier para TNF (cuartiles, sólo cirróticos)



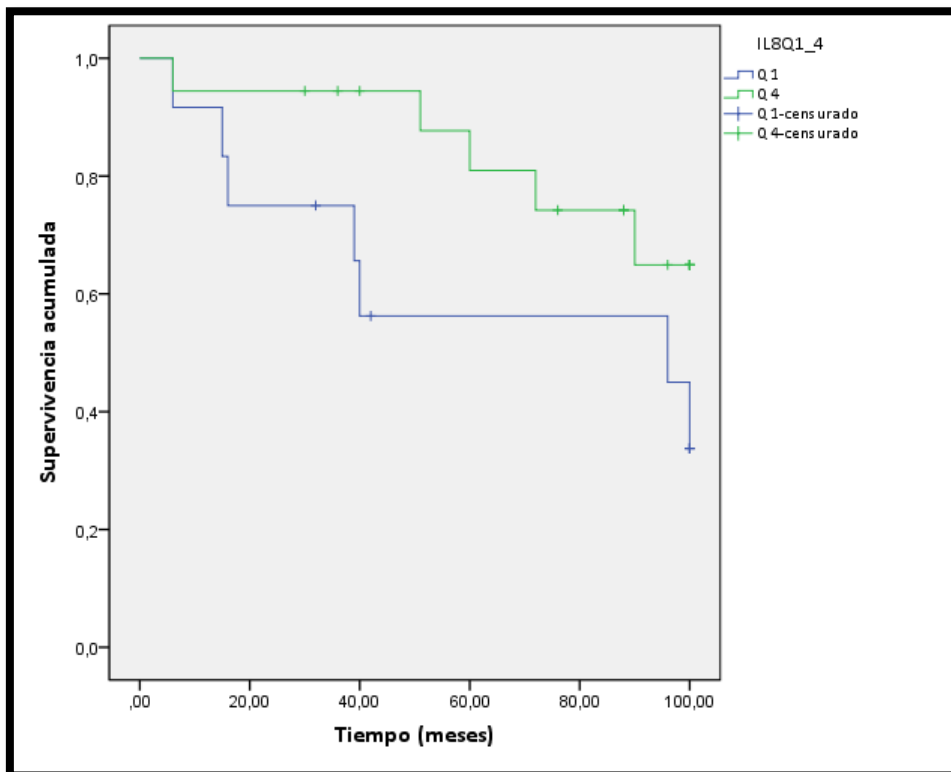
IL-8:

Los pacientes cirróticos que presentaban al inicio concentraciones más bajas (percentil 25) de IL-8 presentaron, de forma significativa, una mayor mortalidad comparado con los que presentaban niveles más elevados (percentil 75).

Tabla IV.45 Supervivencia e IL-8 (Q1 frente a Q4, sólo cirróticos)

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,990	1	0,002
Breslow (Generalized Wilcoxon)	7,697	1	0,006

Tabla IV.46 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (Q 1 frente a Q4, sólo cirróticos)

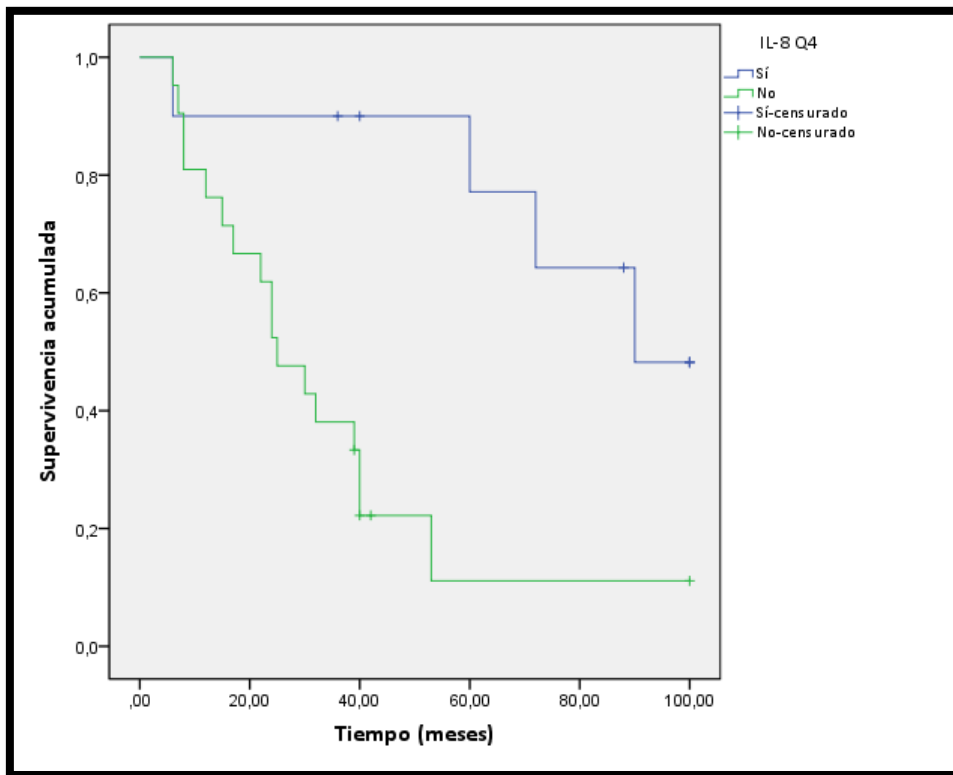


De hecho, entre los pacientes cirróticos, aquellos que presentaban al inicio concentraciones más altas de esta citoquina presentaron una mortalidad significativamente menor que el resto.

Tabla IV.47 Supervivencia e IL-8 (cuartil 4, sólo cirróticos)

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,802	1	0,003
Breslow (Generalized Wilcoxon)	7,268	1	0,007

Gráfico IV-46 Curva de Kaplan-Meier para IL-8 (cuartil 4, sólo cirróticos)



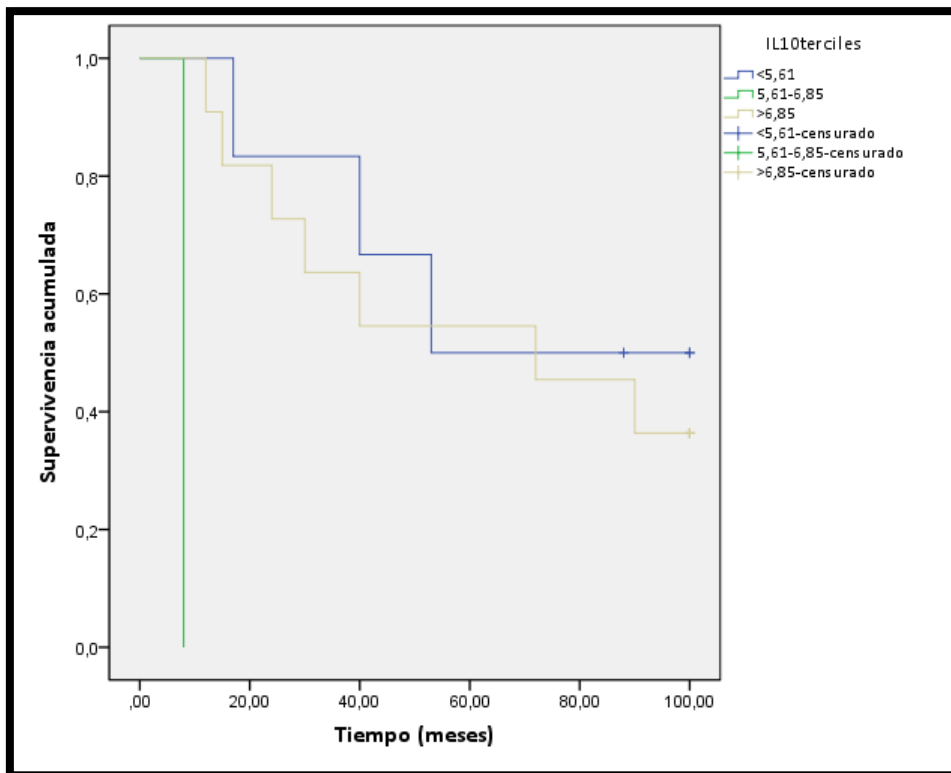
IL-10:

Las concentraciones iniciales de IL-10, tomadas en cuartiles, no se relacionaron significativamente con la mortalidad. Sin embargo, al considerar los niveles de IL-10 en terciles, se encontró una relación significativa con la mortalidad, siendo ésta más elevada en el tercil superior (6,85 pg/ml).

Tabla IV.48 Supervivencia e IL-10 (terciles, sólo cirróticos)

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	17,209	2	< 0,001
Breslow (Generalized Wilcoxon)	17,222	2	< 0,001

Gráfico IV-47 Curva de Kaplan-Meier para IL-10 (terciles, sólo cirróticos)



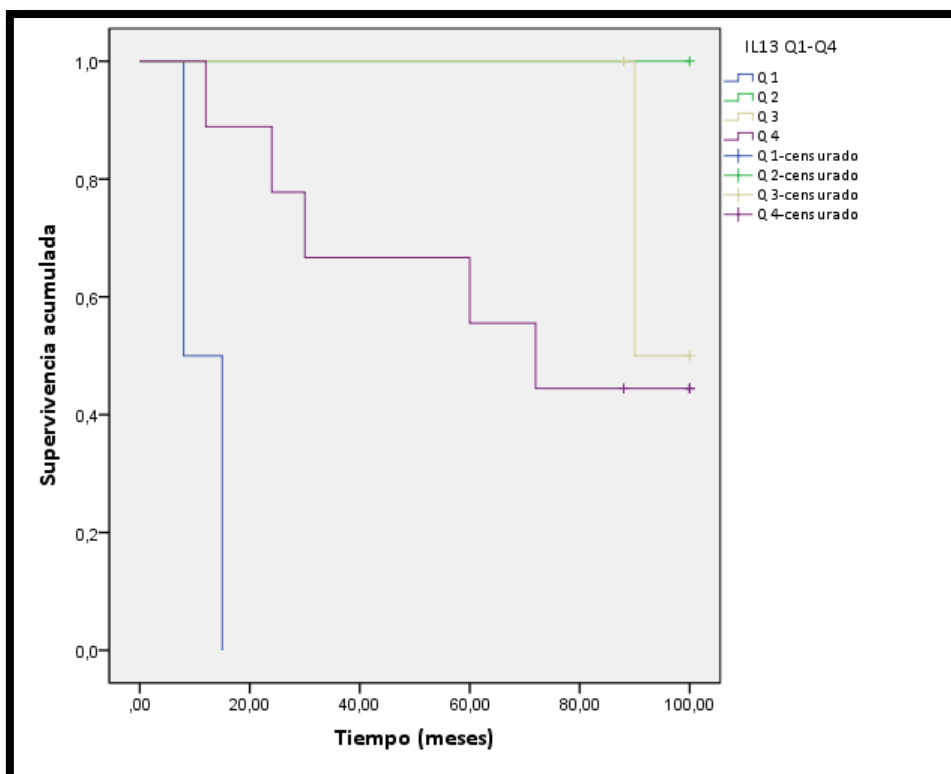
IL-13:

Los niveles iniciales de IL-13 mostraron una relación significativa con la mortalidad, mayor para cifras más elevadas de esta citoquina.

Tabla IV.49 Supervivencia e IL-13 (Q1-Q4, sólo cirróticos)

	X ²	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	12,851	3	0,005
Breslow (Generalized Wilcoxon)	12,676	3	0,005

Gráfico IV-48 Curva de Kaplan-Meier para IL-13 (cuartiles, sólo cirróticos)



Los niveles iniciales de MDA entre los pacientes cirróticos no se relacionaron con la mortalidad. Tampoco se encontró una relación significativa entre la mortalidad y los niveles IL-6, IFN- γ y los receptores solubles del TNF- α . Finalmente, los niveles de IL-4 no se relacionaron con la mortalidad entre los pacientes cirróticos.

5.3. Relación entre niveles iniciales de MDA y citoquinas y mortalidad en pacientes no cirróticos.

No se encontró ninguna relación entre los niveles de MDA ni de ninguna citoquina y la mortalidad. Es probable que ese resultado obedezca a que solamente 3 pacientes no cirróticos murieron en ese periodo.

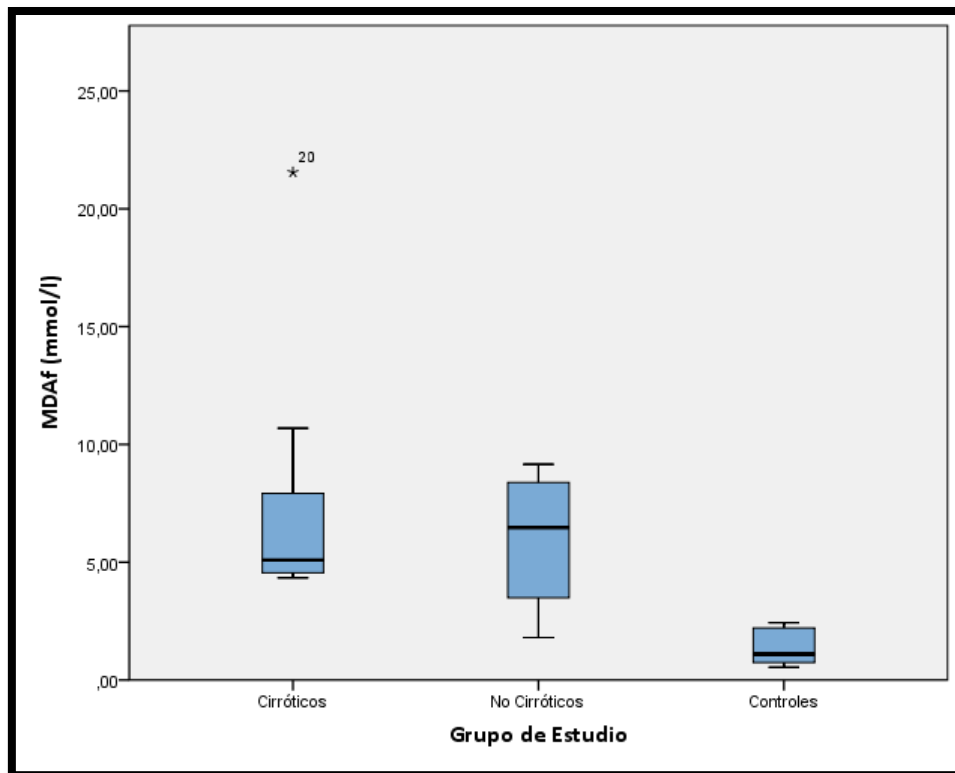
6. Evolución de los niveles de MDA y citoquinas a los seis meses.

MDA:

Transcurridos los seis meses, se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de MDA, que eran superiores en los pacientes comparados con los controles ($\chi^2=17,301$; $p<0,001$). El análisis post-hoc reveló que la diferencia resultaba significativa comparando pacientes con controles ($F=9,003$; $p=0,001$), sin que hubiera diferencias significativas entre los grupos de pacientes (cirróticos y no cirróticos).

Grupo de Estudio	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Controles	13	1,3046	
No Cirróticos	7		5,8829
Cirróticos	7		7,9914
Sig.		1,000	0,241

Gráfico IV-49 Niveles de MDA a los 6 meses



TNF- α :

Los niveles de TNF- α no presentaron diferencias significativas a los seis meses al ser comparadas entre pacientes y controles, si bien se apreció una tendencia a encontrar valores más reducidos entre los controles (KW=4,973; p=0,083).

IL-6:

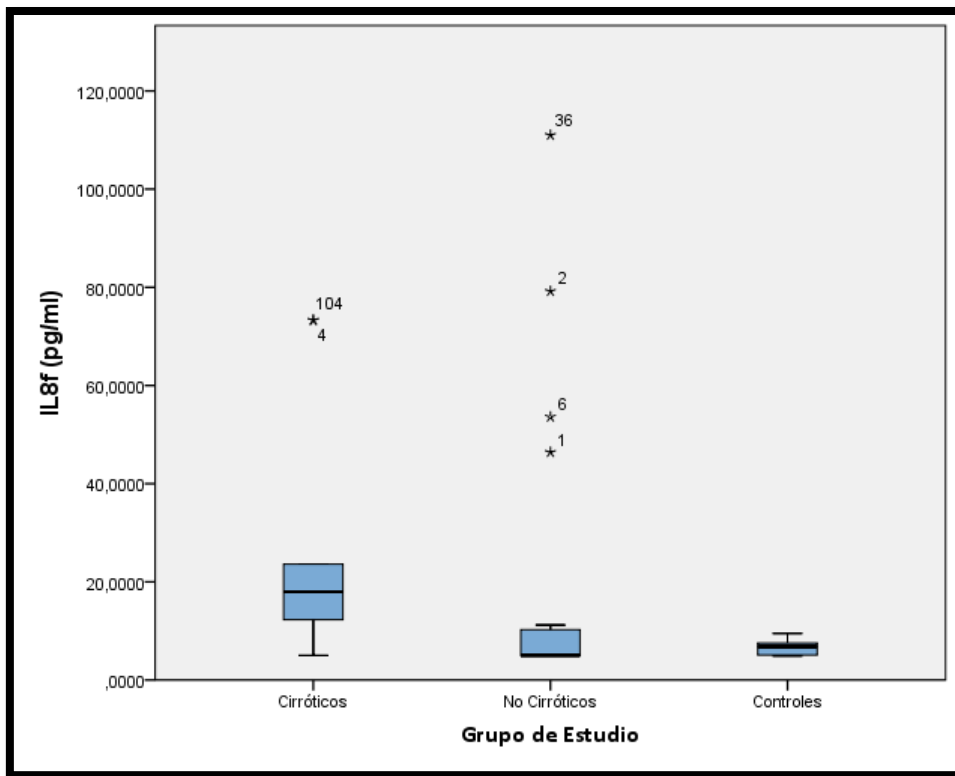
A pesar de encontrarse niveles más elevados de IL-6 a los seis meses entre pacientes cirróticos, la diferencia con respecto a los pacientes no cirróticos y controles no resultó significativa (KW=0,451; p=0,798).

IL-8:

Los niveles de IL-8 a los seis meses se encontraban significativamente más elevados en los pacientes cirróticos (KW=7,889; p=0,019). Sin embargo, un análisis post-hoc no identificó subconjuntos independientes.

Grupo de Estudio	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Controles	15	6,630000
No Cirróticos	19	20,294737
Cirróticos	14	23,427143
Sig.		0,103

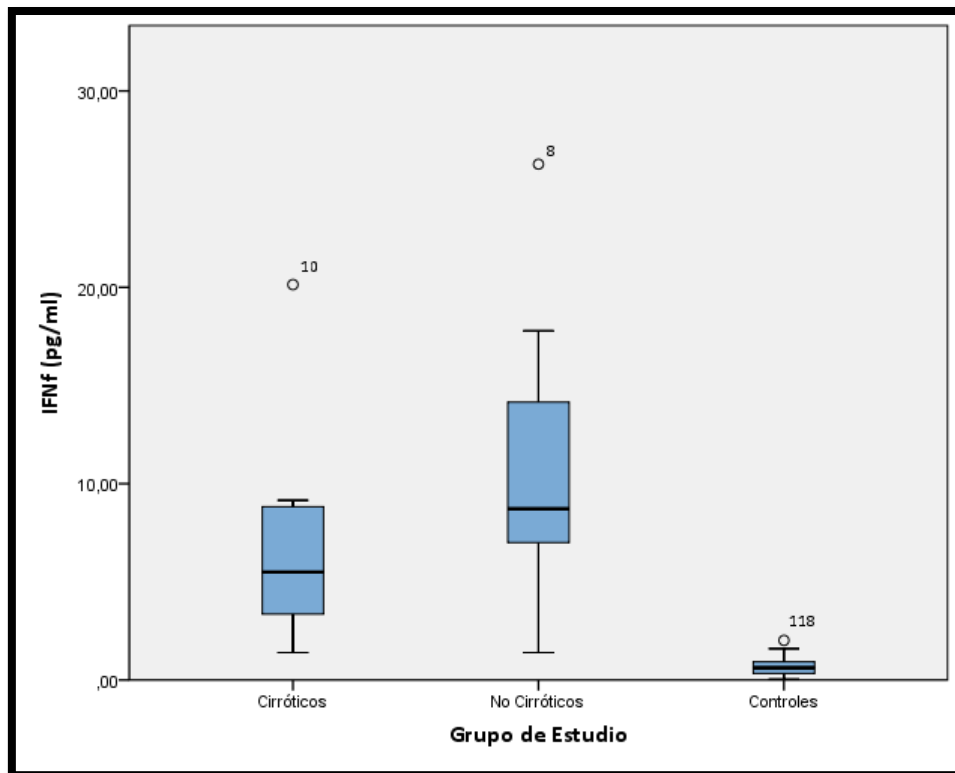
Gráfico IV-50 Niveles de IL-8 a los 6 meses



IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ a los seis meses tendieron a estar más elevados entre los pacientes, comparados con los controles, si bien esta diferencia sólo supuso una tendencia hacia la significación (KW=5,759; p=0,056).

Gráfico IV-51 Niveles de IFN a los 6 meses



IL-4:

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de esta citoquina a los 6 meses (KW=2,827; p=0,243).

IL-10:

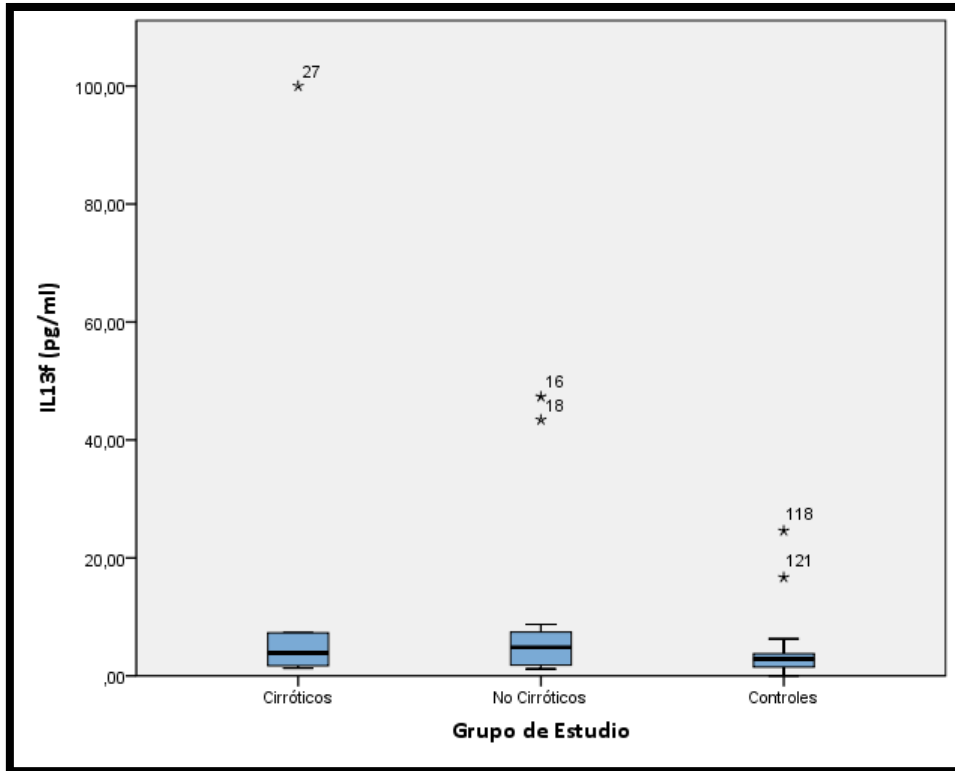
Tampoco se hallaron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de IL-10 a los 6 meses (KW=3,346; p=0,188).

IL-13:

Los niveles de IL-13 a los seis meses resultaron más elevados en los pacientes cirróticos y en los controles, aunque esta diferencia no resultó significativa (KW=1,863;

p=0,394), ni se identificaron subconjuntos independientes mediante la prueba de Student-Newman-Keuls.

Gráfico IV-52 Niveles de IL-13 a los 6 meses



7. Evolución de los valores de MDA y de las citoquinas con respecto a la abstinencia.

7.1. Evolución de los valores de MDA y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando todos los pacientes (cirróticos y no cirróticos).

MDA:

Los niveles de MDA disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. El descenso fue más acusado entre los que no hicieron abstinencia.

Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación
factor1	Traza de Pillai	0,554	13,662(a)	1,000	11,000	0,004
	Lambda de Wilks	0,446	13,662(a)	1,000	11,000	0,004
	Traza de Hotelling	1,242	13,662(a)	1,000	11,000	0,004
	Raíz mayor de Roy	1,242	13,662(a)	1,000	11,000	0,004
factor1 * abstinen	Traza de Pillai	0,358	6,132(a)	1,000	11,000	0,031
	Lambda de Wilks	0,642	6,132(a)	1,000	11,000	0,031
	Traza de Hotelling	0,557	6,132(a)	1,000	11,000	0,031

Hotelling

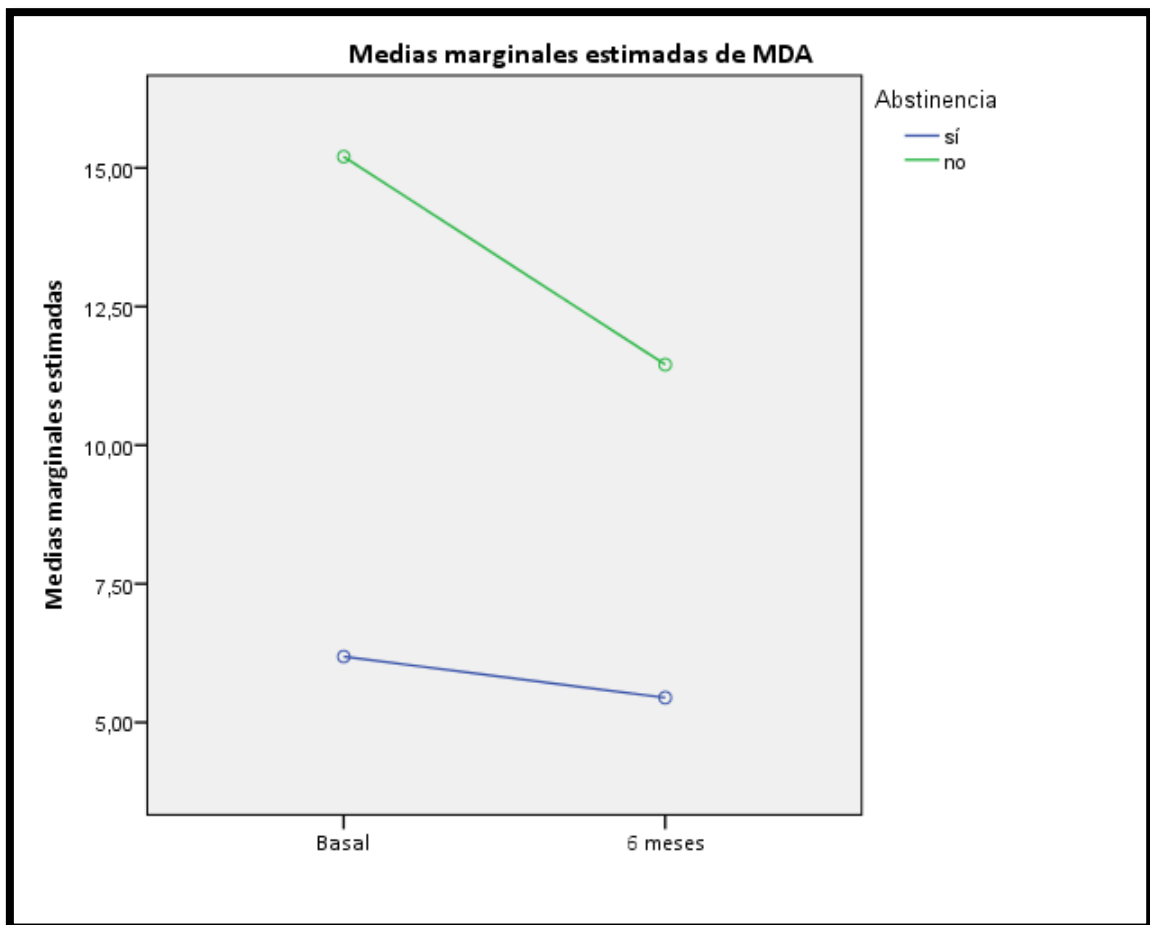
Raíz mayor de 0,557 6,132(a) 1,000 11,000 0,031

Roy

Tabla IV.53 Interacción entre abstinencia y cambio en los niveles de MDA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	2029,723	1	2029,723	42,993	< 0,001
abstinenen	312,485	1	312,485	6,619	0,026
Error	519,314	11	47,210		

Gráfico IV-53 Cambio en niveles de MDA según abstinencia



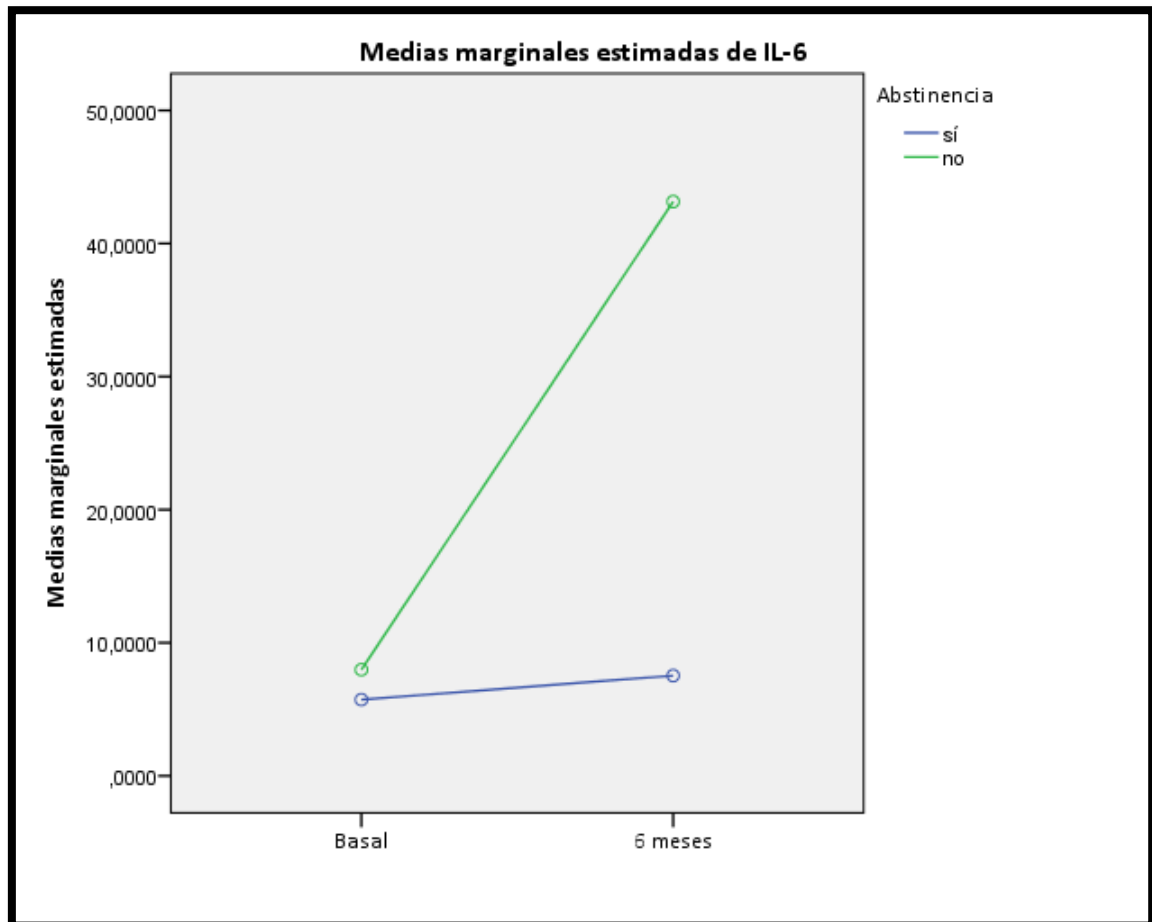
TNF- α :

Los niveles de TNF α aumentaron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. No se encontraron diferencias significativas con respecto al cambio observado.

IL-6:

Los niveles de IL-6 aumentaron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Sin embargo, el incremento fue significativamente más acusado entre los que no hicieron abstinencia ($p < 0,001$ para la interacción).

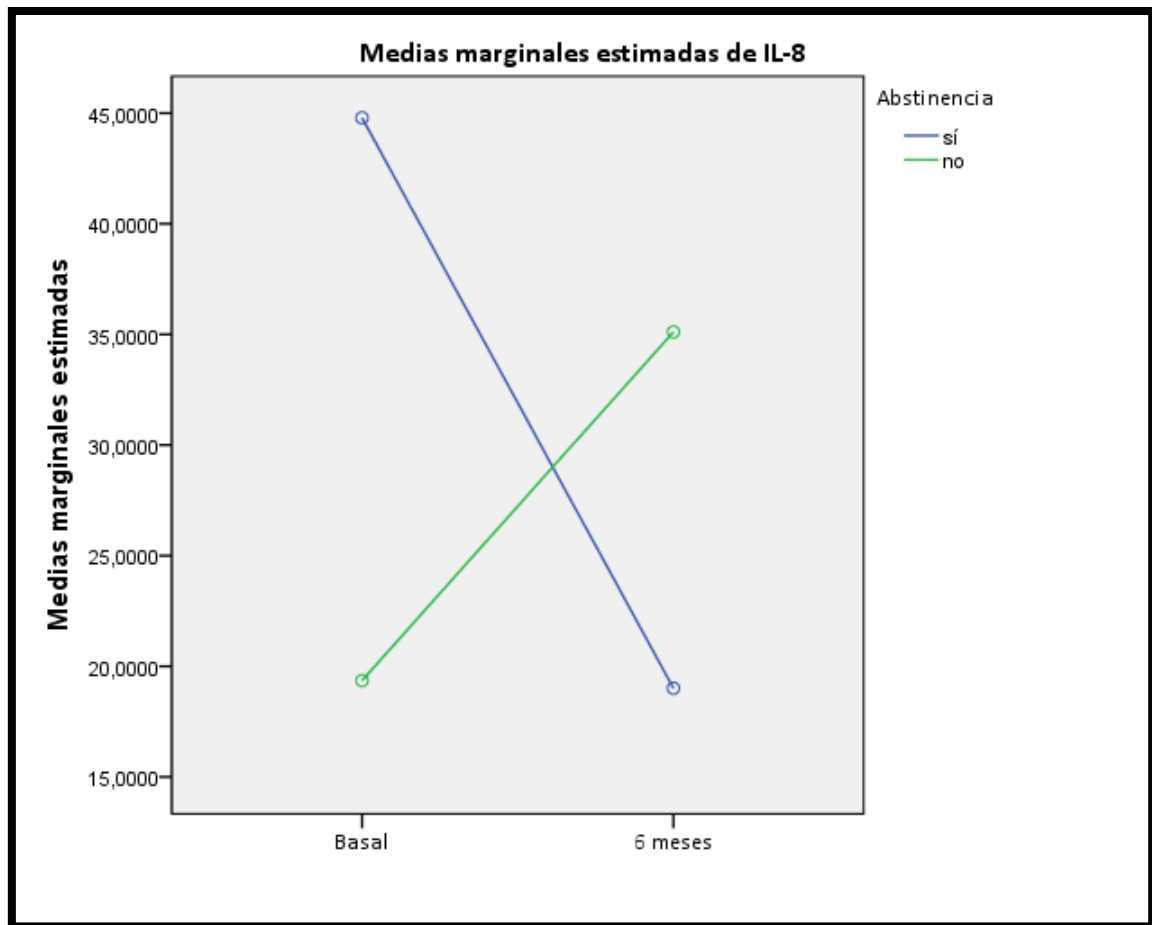
Gráfico IV-54 Cambio en los niveles de IL-6 según abstinencia



IL-8:

Los niveles de IL-8 aumentaron en los pacientes que no hicieron abstinencia y disminuyeron en los que sí ($p=0,036$ para la interacción).

Gráfico IV-55 Cambio en los niveles de IL-8 según Abstinencia



TNFRS 1 y 2:

Los niveles de TNFRs60 disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que continuaron consumiendo alcohol. No se encontraron diferencias significativas con respecto al cambio en los valores.

Los niveles de TNFRs80 disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Había una tendencia para un descenso más acusado entre los que seguían consumiendo alcohol, pero no resultó significativa.

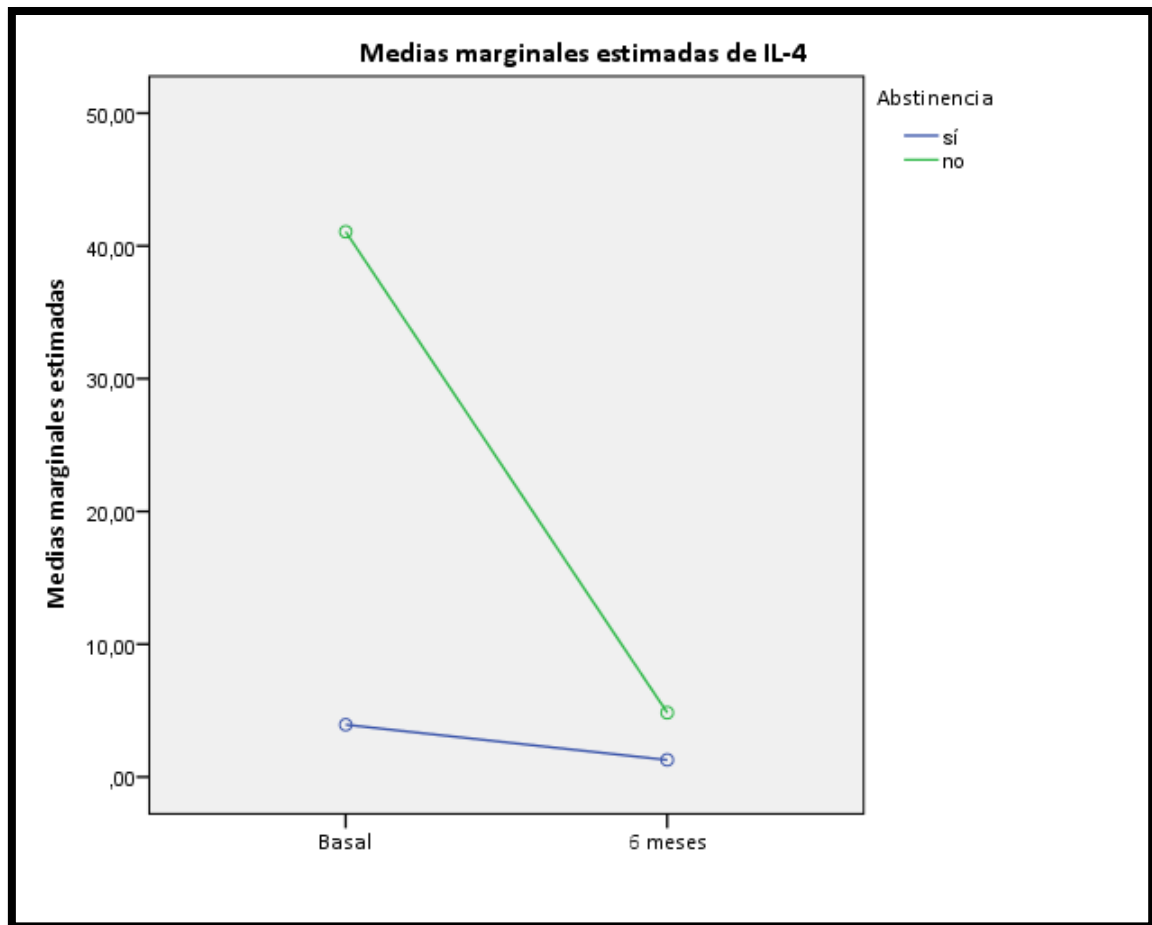
IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ aumentaron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. El aumento fue discretamente más acusado entre los que hicieron abstinencia, pero no resultó significativo.

IL-4:

Los niveles de IL-4 disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Sin embargo, la disminución fue significativamente más acusada entre los que no hicieron abstinencia ($p=0,013$ para la interacción).

Gráfico IV-56 Cambio en los niveles de IL-4 según Abstinencia



IL-10:

Los niveles de IL-10 aumentaron en los pacientes que hicieron abstinencia y disminuyeron en los pacientes que no la hicieron. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

IL-13:

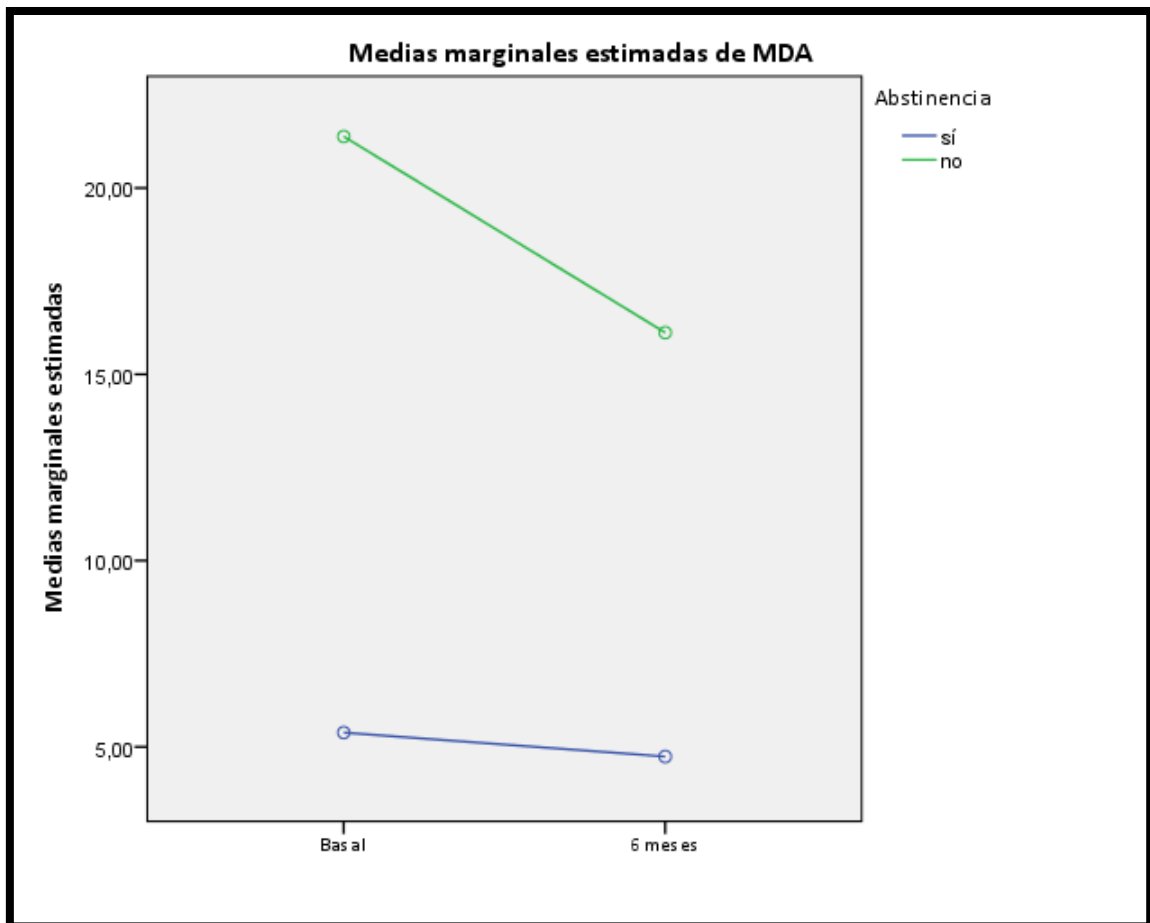
Las concentraciones de IL-13 disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no la hicieron. No hubo diferencias significativas en cuanto a la magnitud de esta disminución.

7.2. Evolución de los valores de MDA y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando los pacientes cirróticos.

MDA:

Los niveles de MDA disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Esta disminución fue significativamente más acusada entre los que no hicieron abstinencia ($p=0,012$ para la interacción).

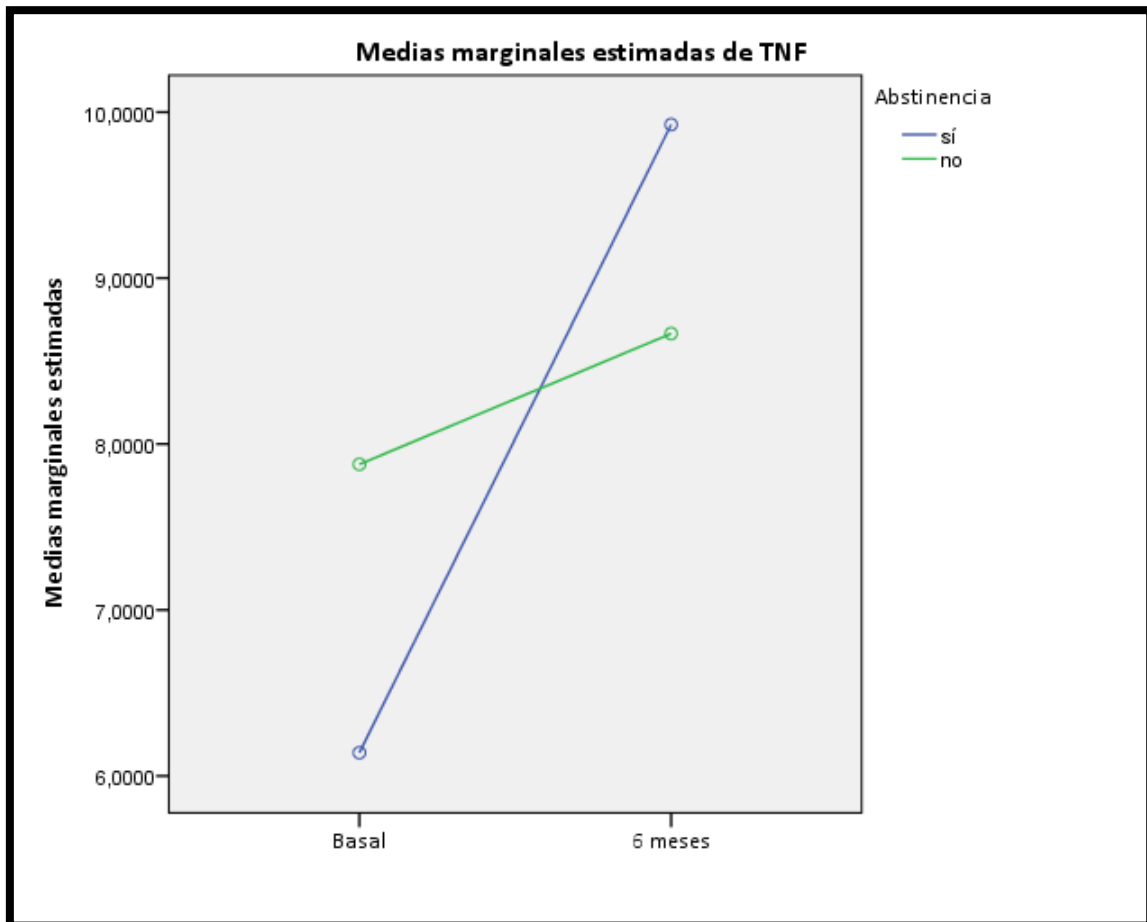
Gráfico IV-57 Cambio en los niveles de MDA según abstinencia



TNF- α :

Los valores de TNF α aumentaron tanto en los pacientes cirróticos que hicieron abstinencia como en los que no. El aumento no fue significativamente mayor entre los pacientes que hicieron abstinencia ($p < 0,001$ para la interacción).

Gráfico IV-58 Cambio en los niveles de TNF según Abstinencia



IL-6:

Los valores de IL-6 aumentaron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Entre los pacientes que no hicieron abstinencia, el incremento de IL-6 fue más acusado pero la diferencia no resultó significativa.

IL-8:

Los niveles de IL-8 disminuyeron entre los pacientes que hicieron abstinencia y aumentaron entre los que no la hicieron. Sin embargo, la diferencia encontrada no resultó significativa.

TNFRS 1 y 2:

Los niveles de TNFRs60 disminuyeron tanto en pacientes que hicieron abstinencia como en los que continuaron consumiendo alcohol. La disminución tendía a ser más acusada entre los que hicieron abstinencia, pero esta diferencia no resultó significativa.

Los niveles de TNFRs80 disminuyeron entre los pacientes cirróticos que hicieron abstinencia y aumentaron entre los que continuaron consumiendo alcohol, si bien la diferencia no resultó significativa.

No se encontraron diferencias en cuanto a la evolución de los cocientes entre los niveles de ambos receptores.

IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ aumentaron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. Había una tendencia hacia un aumento más acusado entre los pacientes que sí hicieron abstinencia, pero la diferencia no resultó significativa.

IL-4:

Los niveles de IL-4 disminuyeron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como entre los que no. La disminución fue más acusada entre los que no hicieron abstinencia, pero la diferencia no resultó significativa.

IL-10:

Los niveles de IL-10 disminuyeron en los pacientes que no hicieron abstinencia y aumentaron en los que no la hicieron, aunque la diferencia no resultó significativa.

IL-13:

Los niveles de IL-13 disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que continuaron consumiendo alcohol, sin que se apreciaran diferencias significativas en cuanto a la magnitud de los cambios.

7.3. Evolución de los valores de MALD y citoquinas con respecto a la abstinencia considerando los pacientes no cirróticos.

MALD:

Los niveles de MALD disminuyeron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no la hicieron. Los pacientes que no hicieron abstinencia presentaron un descenso más acusado (aunque no resultó significativo).

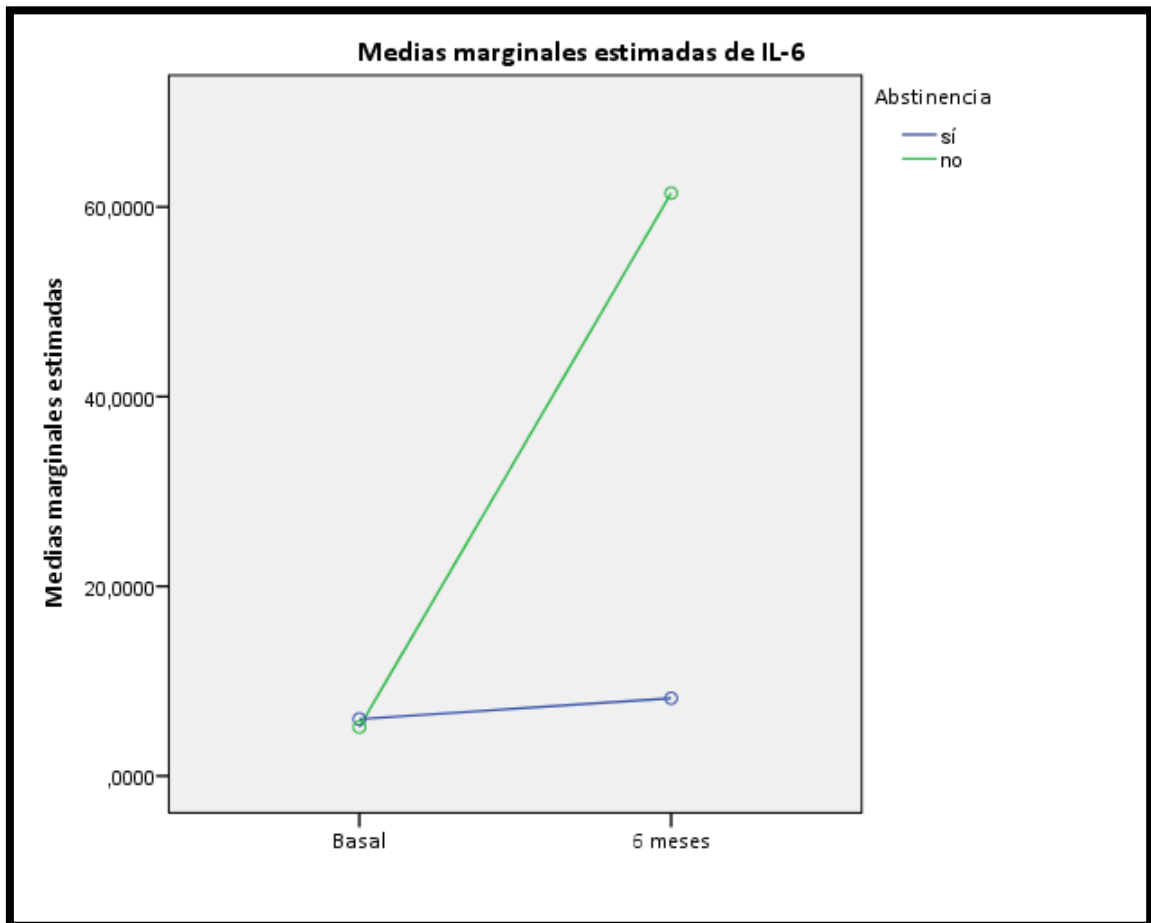
TNF- α :

Los niveles de TNF α aumentaron tanto en los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. El incremento fue más acusado entre los que no hicieron abstinencia, pero la diferencia no resultó significativa.

IL-6:

Los niveles de IL-6 aumentaron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como entre los que continuaron consumiendo alcohol. Los que no hicieron abstinencia presentaron una marcada tendencia a un incremento más acusado (p=0,074 para la interacción).

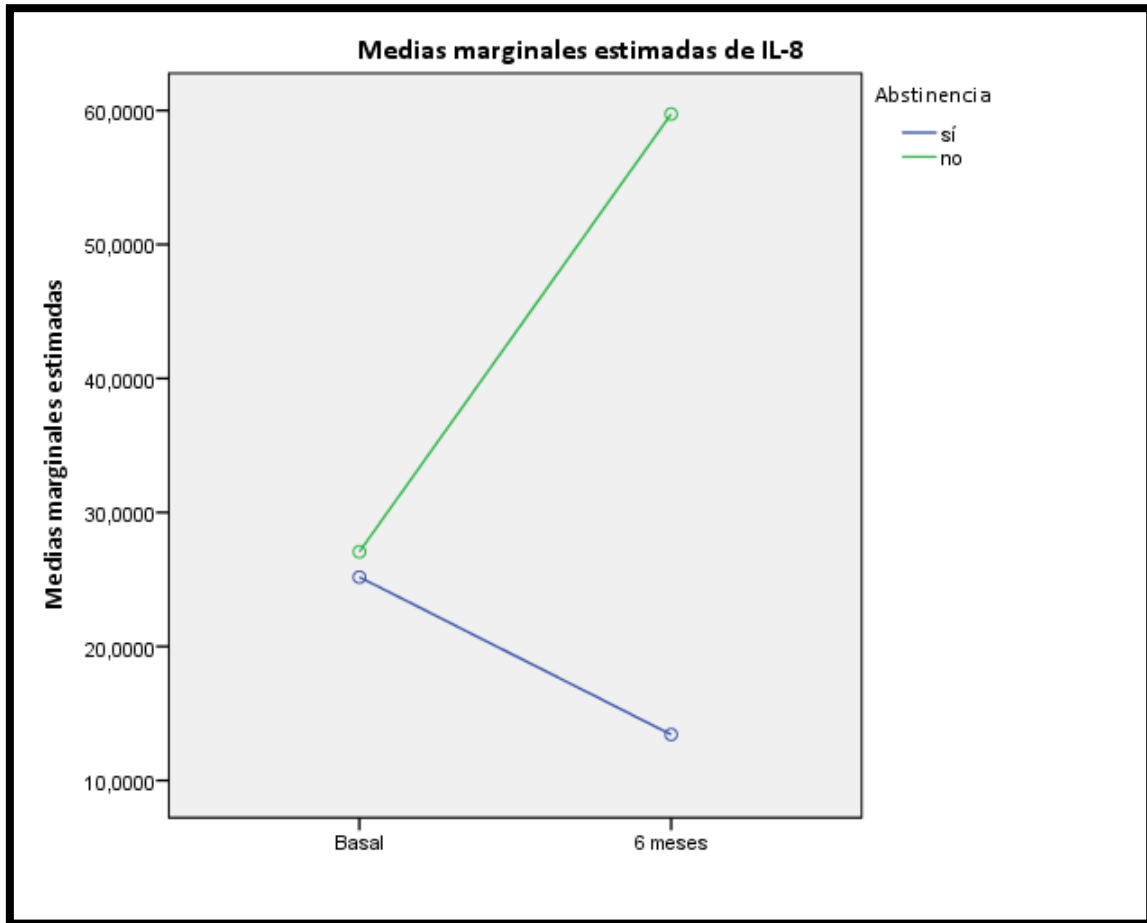
Gráfico IV-59 Cambio en los niveles de IL-6 según Abstinencia



IL-8:

Los niveles de IL-8 aumentaron entre los pacientes no cirróticos que no hicieron abstinencia y disminuyeron entre los que dejaron de consumir alcohol ($p=0,002$ para la interacción).

Gráfico IV-60 Evolución de los niveles de IL-8 según Abstinencia



TNFRS 1 y 2:

Los niveles de TNFRs60 disminuyeron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. No hubo diferencias en cuanto a la magnitud del descenso.

Los niveles de TNFRs80 descendieron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como entre los que no.

Los valores del cociente entre los niveles de ambos receptores tendieron a disminuir tanto entre los que observaron abstinencia como entre los que no, sin que se encontraran diferencias significativas en cuanto a la magnitud del descenso.

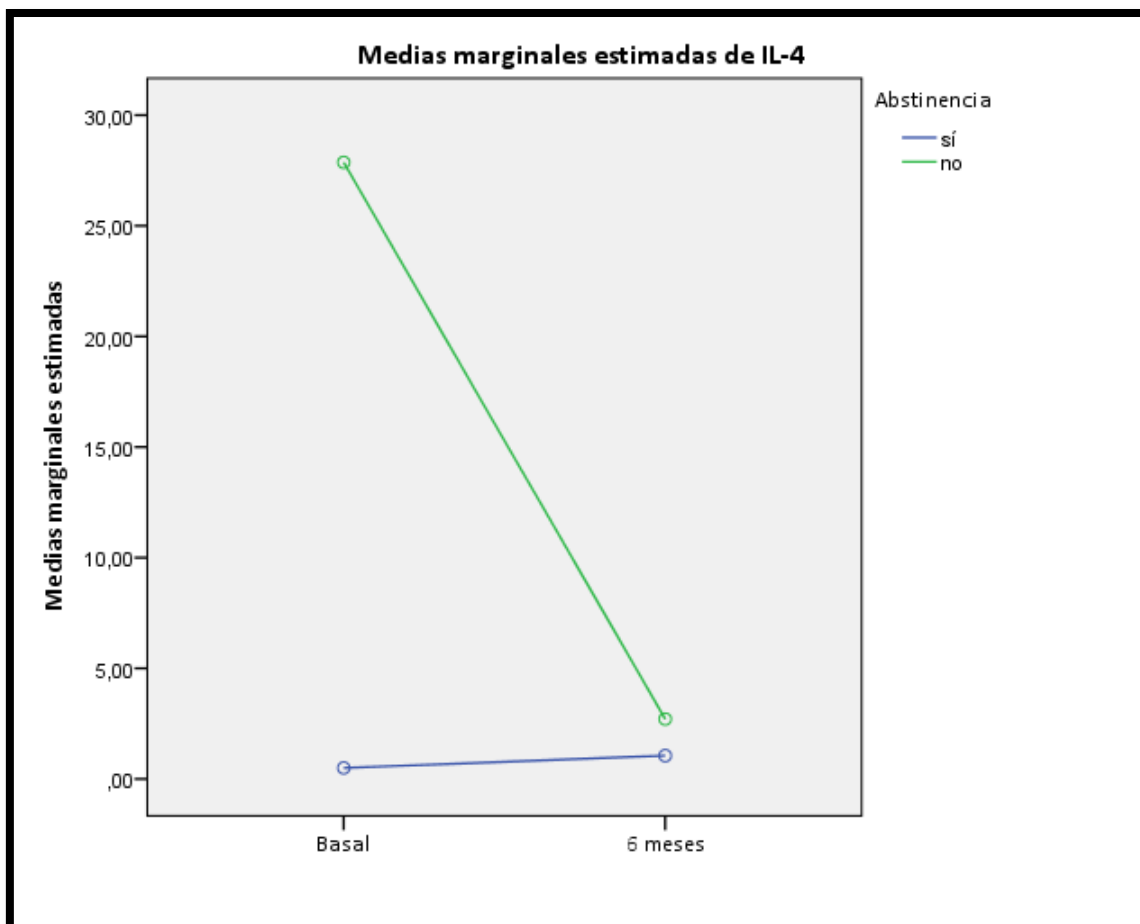
IFN- γ :

Los niveles de IFN- γ aumentaron tanto entre los pacientes que hicieron abstinencia como en los que no. No hubo diferencias en cuanto al incremento.

IL-4:

Los niveles de IL-4 disminuyeron entre los pacientes que no hicieron abstinencia y aumentaron entre los que dejaron de consumir alcohol. Había una fuerte tendencia a que esta diferencia resultara estadísticamente significativa ($p=0,076$ para la interacción).

Gráfico IV-61 Cambio en los niveles de IL-4 según Abstinencia



IL-10:

Los niveles de IL-10 aumentaron en los pacientes que hicieron abstinencia y disminuyeron entre los que continuaron consumiendo alcohol. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

IL-13:

Los niveles de IL-13 disminuyeron en los pacientes que hicieron abstinencia y tendieron a aumentar entre los que continuaron consumiendo alcohol, sin llegarse a encontrar diferencias significativas.

8. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas y la mortalidad.

8.1. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando todos pacientes (cirróticos y no cirróticos).

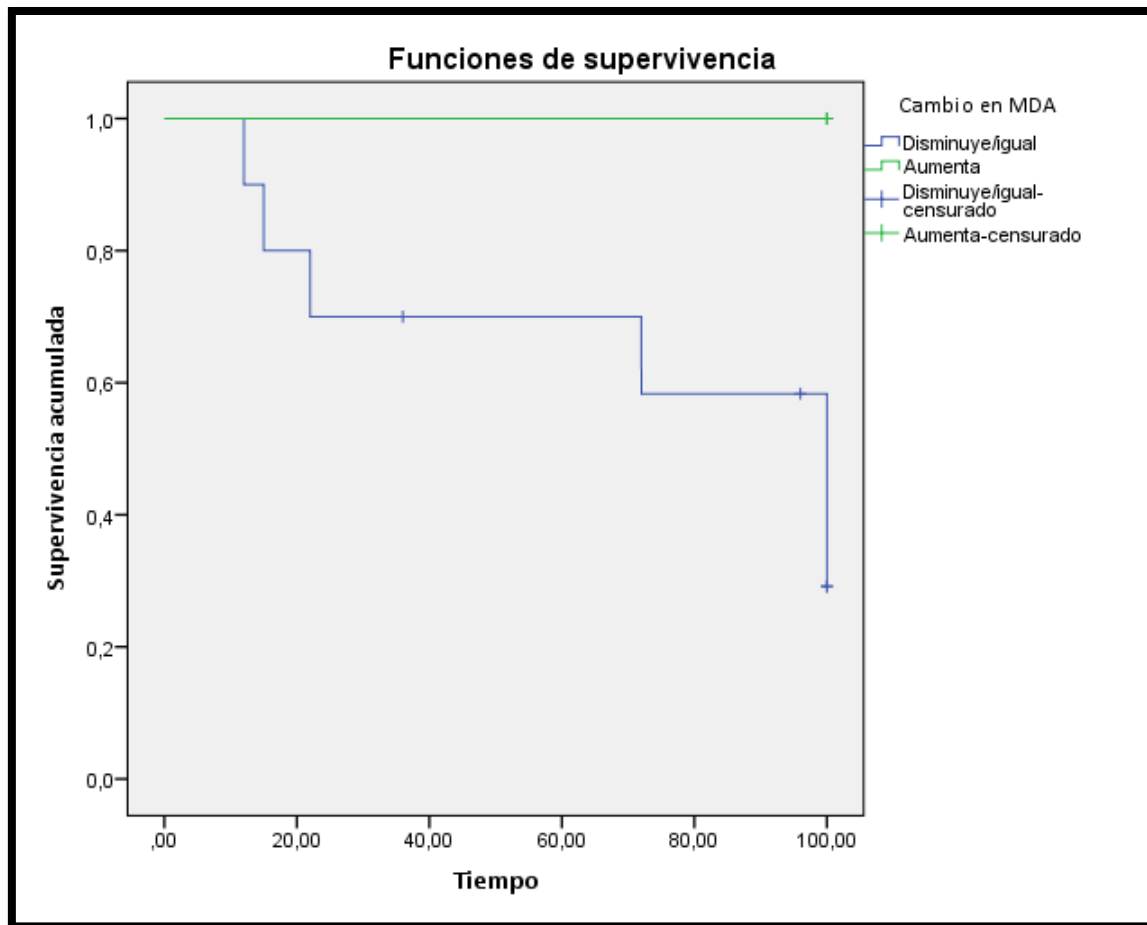
MDA:

El descenso en los niveles de MDA presentó una tendencia a relacionarse con una mayor mortalidad.

Tabla IV.54 Supervivencia y cambio en niveles de MDA

	X ²	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,166	10	0,075
Breslow (Generalized Wilcoxon)	2,723	1	0,099

Gráfico IV-62 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en niveles de MDA



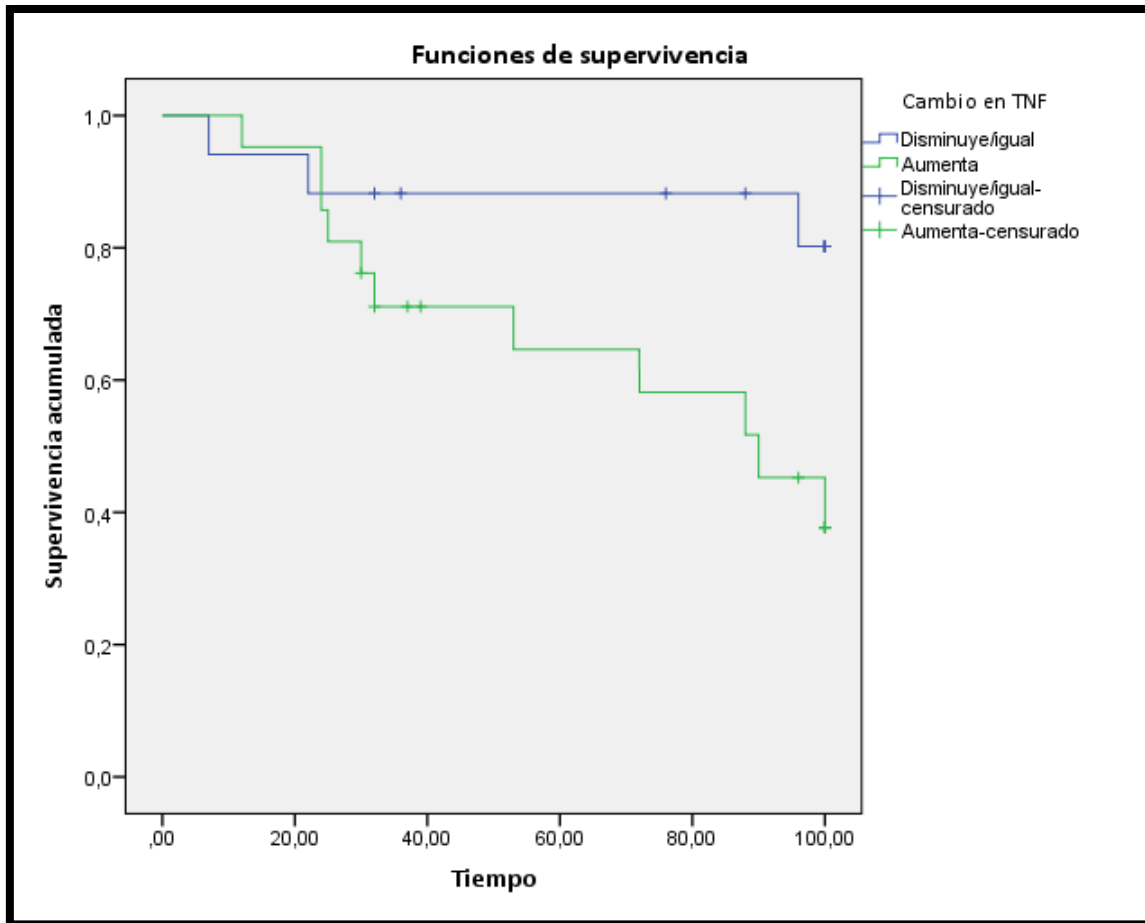
TNF- α :

El aumento en los niveles de TNF- α mostró una fuerte tendencia a relacionarse con una mayor mortalidad.

Tabla IV.55 Supervivencia y cambio en niveles de TNF

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,915	1	0,027
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,525	1	0,060

Gráfico IV-63 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de TNF



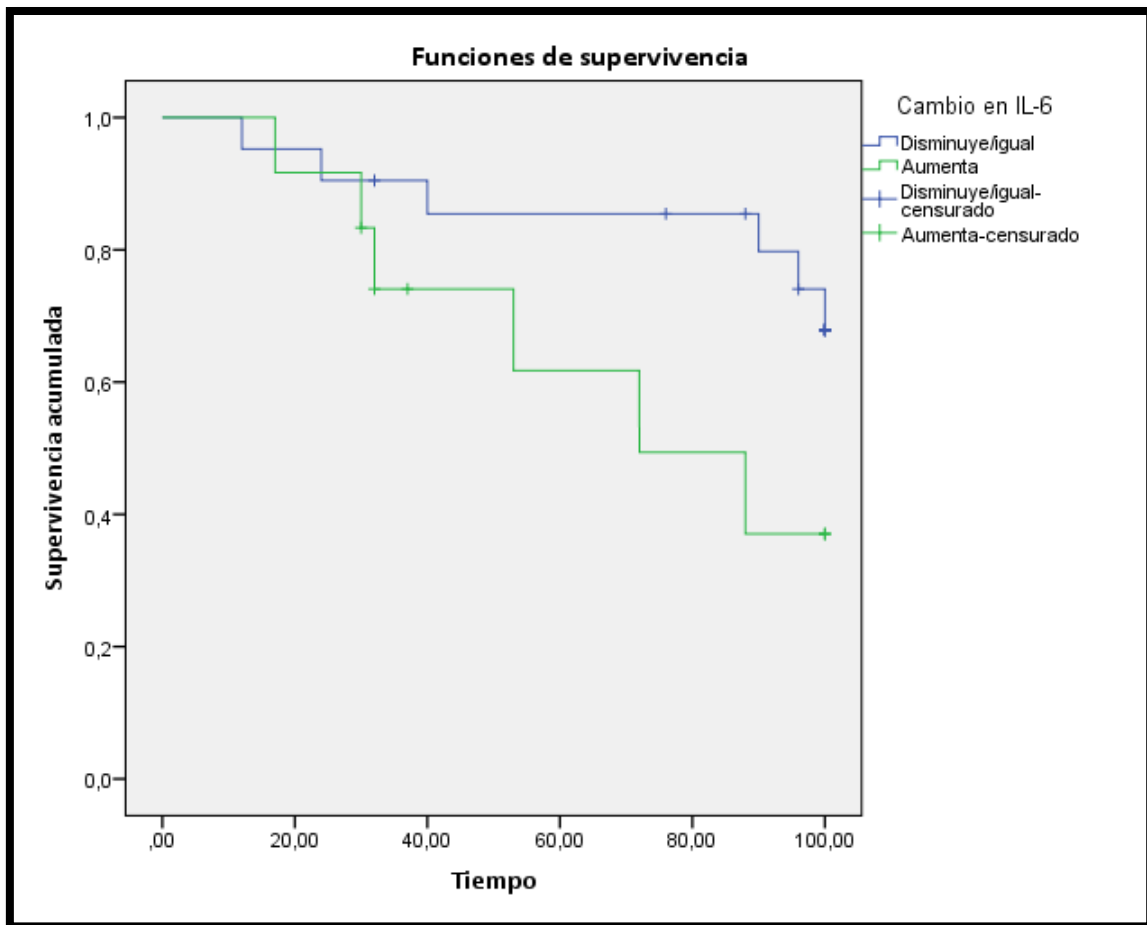
IL-6:

También el aumento en los niveles de IL-6 mostró una tendencia a relacionarse con una mayor mortalidad.

Tabla IV.56 Supervivencia y cambio en niveles de IL-6

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,250	1	0,071
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,113	1	0,078

Gráfico IV-64 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en niveles de IL-6



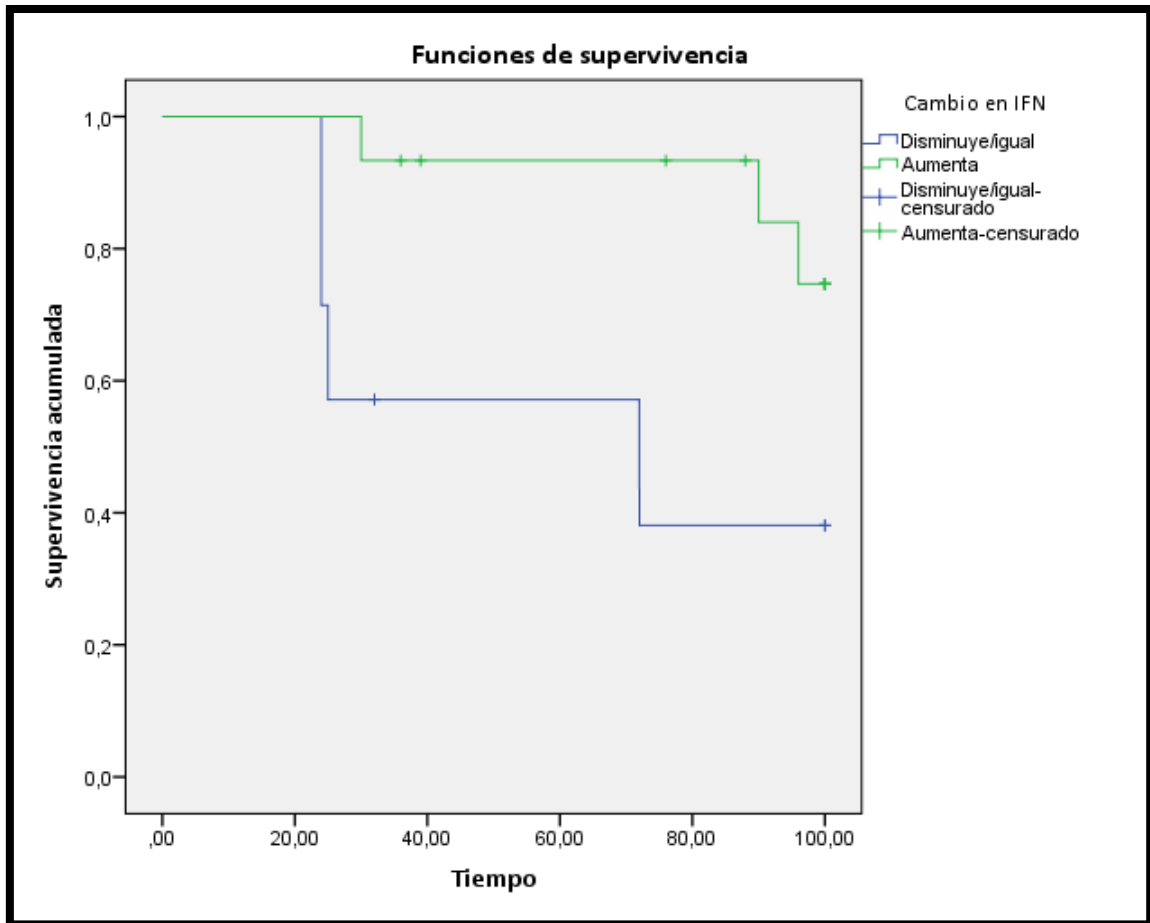
IFN- γ :

La disminución o igualdad en las concentraciones de IFN- γ se asoció significativamente a una mayor mortalidad.

Tabla IV.57 Supervivencia y cambio en los niveles de IFN

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,565	1	0,033
Breslow (Generalized Wilcoxon)	5,870	1	0,015

Gráfico IV-65 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de IFN



IL-8, TNFRS 1 y 2:

No se encontraron diferencias significativas entre el cambio en los niveles de IL-8, TNFRS60s o TNFRS80s y la mortalidad.

IL-4, IL-10 e IL-13:

Tampoco se relacionaron significativamente con la mortalidad el cambio en los niveles de IL-4, IL-10 o IL-13.

8.2. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando los pacientes cirróticos.

MDA:

No se encontró relación entre el cambio en las concentraciones de MDA y la mortalidad entre los pacientes cirróticos.

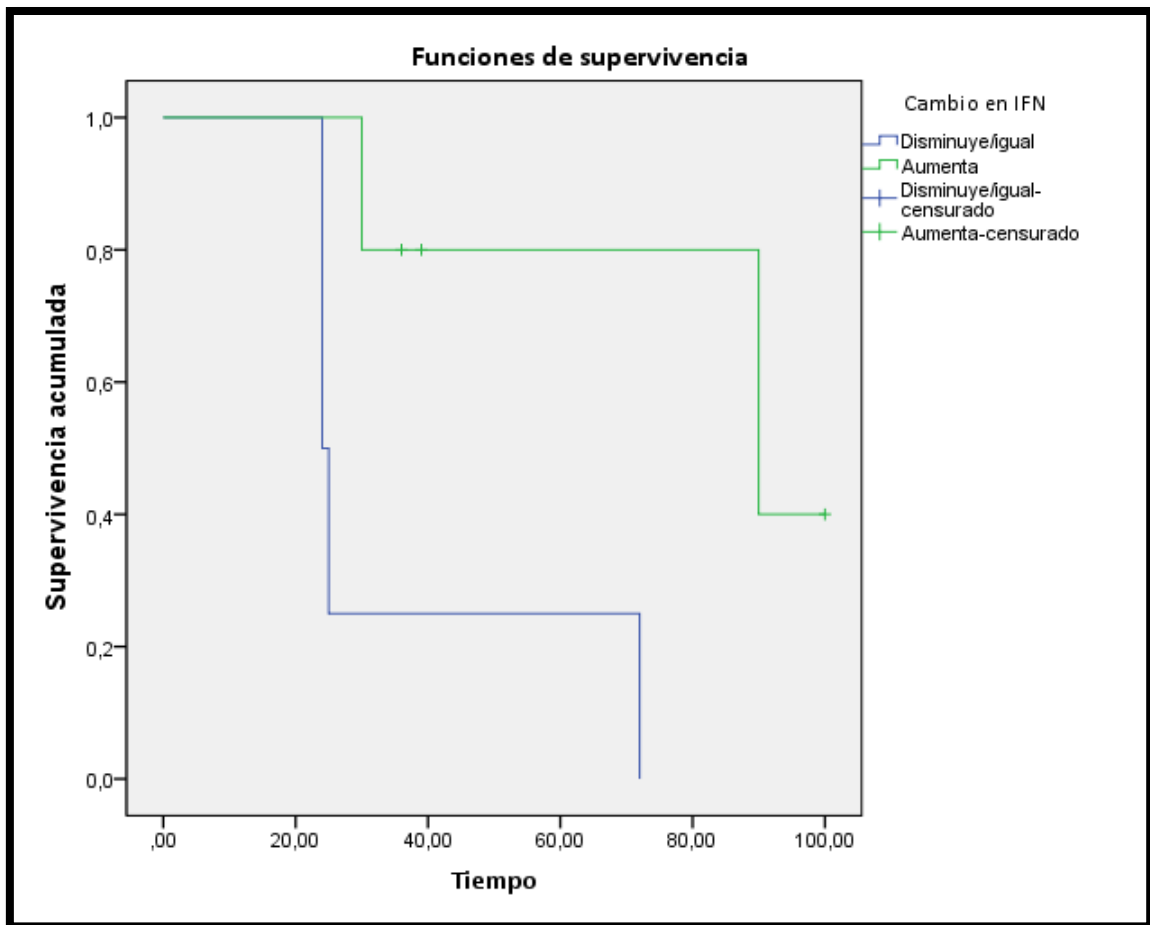
IFN- γ :

La disminución o igualdad en los niveles de IFN- γ se relacionó significativamente con la mortalidad.

Tabla IV.58 Supervivencia y cambio en los niveles de IFN

	χ^2	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,422	1	0,020
Breslow (Generalized Wilcoxon)	4,923	1	0,027

Gráfico IV-66 Curva de Kaplan-Meier para el cambio en los niveles de IFN



TNF- α , IL-6 e IL-8; TNFRS 1 y 2::

No hubo diferencias en la mortalidad considerando el cambio en los niveles de TNF α , IL-6, IL-8 y ambos receptores solubles del TNF- α .

IL-4 e IL-10:

Tampoco se relacionaron con la mortalidad los cambios en las concentraciones de IL-4 o de IL-10.

IL-13:

Dado que todas las determinaciones de IL-13 que había de pacientes cirróticos mostraban igualdad o decremento en los niveles no se pudo comparar su comportamiento con respecto a la mortalidad.

8.3. Relación entre el cambio en los niveles de MDA y citoquinas considerando los pacientes no cirróticos.

Cuando se consideró únicamente al grupo de pacientes no afectados de cirrosis hepática no se encontró en ningún caso relaciones significativas entre la los cambios en las concentraciones de citoquinas y productos de peroxidación lipídica con respecto a la mortalidad.

9 Análisis de regresión de Cox de la mortalidad.

Se elaboró un modelo teniendo en cuenta las variables que con mayor significación se asociaron a la mortalidad, tomando variables relacionadas con la función hepática (niveles de albúmina, actividad de la protrombina, ascitis y encefalopatía hepática), con el estado nutricional (la categoría nutricional) y con las citoquinas que mayor relación mostraron con la mortalidad en el análisis univariante (TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ).

El modelo resultante únicamente refleja la encefalopatía como variable pronóstica estadísticamente significativa.

Tabla IV.59 Pruebas omnibus

Paso	-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
		χ^2	Gl	Sig.	χ^2	gl	Sig.	χ^2	gl	Sig.
1 ^a	104,954	34,873	10	<0,001	26,835	10	0,003	26,835	10	0,003
2 ^b	104,993	34,690	9	<0,001	0,039	1	0,843	26,796	9	0,002
3 ^c	105,029	34,666	8	<0,001	0,036	1	0,849	26,760	8	0,001
4 ^d	105,233	34,429	7	<0,001	0,204	1	0,651	26,555	7	< 0,001
5 ^e	106,200	33,370	5	<0,001	0,967	2	0,617	25,588	5	< 0,001
6 ^f	106,731	33,160	4	<0,001	0,530	1	0,466	25,058	4	< 0,001
7 ^g	107,144	32,983	3	<0,001	0,413	1	0,520	24,644	3	< 0,001
8 ^h	108,208	32,344	2	<0,001	1,064	1	0,302	23,581	2	< 0,001

Tabla IV.60 Variables en la ecuación (pasos 1-3)

		B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1	Encefalopatía	3,052	1,054	8,386	1	0,004	21,159
	Ascitis	1,007	1,106	0,829	1	0,363	2,737
	Categoría nutricional			0,854	2	0,652	
	Nombre de variable valnuteval(1)	-0,516	0,704	0,537	1	0,464	0,597
	Nombre de variable valnuteval(2)	-0,727	0,827	0,774	1	0,379	0,483
	Albúmina	0,500	0,482	1,076	1	0,300	1,648
	AP	0,004	0,022	0,038	1	0,845	1,004
	TNF- α	0,028	0,120	0,057	1	0,812	1,029
	IL-6	0,019	0,044	0,194	1	0,660	1,019
	IL-8	0,008	0,008	0,993	1	0,319	1,008
	IFN- γ	-0,133	0,092	2,122	1	0,145	0,875
Paso 2	Encefalopatía	2,988	1,010	8,751	1	0,003	19,848
	Ascitis	0,907	1,003	0,819	1	0,366	2,478
	Categoría nutricional			1,083	2	0,582	
	Nombre de variable valnuteval(1)	-0,543	0,695	0,611	1	0,434	0,581
	Nombre de variable valnuteval(2)	-0,781	0,781	1,001	1	0,317	0,458
	Albúmina	0,516	0,476	1,173	1	0,279	1,675
	TNF- α	0,022	0,114	0,038	1	0,846	1,022
	IL-6	0,017	0,042	0,159	1	0,690	1,017
	IL-8	0,007	0,007	0,987	1	0,320	1,007
	IFN- γ	-0,135	0,092	2,147	1	0,143	0,873
Paso 3	Encefalopatía	2,981	1,014	8,642	1	0,003	19,717
	Ascitis	0,901	1,004	0,804	1	0,370	2,461
	Categoría nutricional			1,195	2	0,550	
	Nombre de variable valnuteval(1)	-0,569	0,682	0,694	1	0,405	0,566
	Nombre de variable valnuteval(2)	-0,807	0,776	1,082	1	0,298	0,446
	Albúmina	0,524	0,477	1,205	1	0,272	1,688
	IL-6	0,018	0,041	0,201	1	0,654	1,018
	IL-8	0,008	0,007	1,270	1	0,260	1,008
	IFN- γ	-0,136	0,093	2,168	1	0,141	0,873

Tabla IV.61 Variables en la ecuación (pasos 4-8)

Paso 4	Encefalopatía	2,756	0,852	10,458	1	0,001	15,733
	Ascitis	1,139	0,832	1,877	1	0,171	3,125
	Categoría nutricional			1,004	2	0,605	
	Nombre de variable valnuteval(1)	-0,563	0,678	,690	1	0,406	0,569
	Nombre de variable valnuteval(2)	-0,652	0,691	,891	1	0,345	0,521
	Albúmina	0,482	0,464	1,082	1	0,298	1,620
	IL-8	0,007	0,007	1,242	1	0,265	1,007
	IFN- γ	-0,150	0,087	2,948	1	0,086	0,861
Paso 5	Encefalopatía	2,742	0,858	10,204	1	0,001	15,524
	Ascitis	1,070	0,802	1,781	1	0,182	2,916
	Albúmina	0,304	0,415	,539	1	0,463	1,356
	IL-8	0,006	0,006	,962	1	0,327	1,006
	IFN- γ	-0,151	0,083	3,339	1	0,068	0,860
Paso 6	Encefalopatía	2,742	0,857	10,248	1	0,001	15,521
	Ascitis	0,784	0,699	1,257	1	0,262	2,190
	IL-8	0,004	0,006	,494	1	0,482	1,004
	IFN- γ	-0,143	0,083	2,945	1	0,086	0,867
Paso 7	Encefalopatía	2,666	0,843	9,990	1	0,002	14,376
	Ascitis	0,738	0,691	1,141	1	0,285	2,092
	IFN- γ	-0,139	0,082	2,890	1	0,089	0,870
Paso 8	Encefalopatía	3,160	0,732	18,662	1	0,000	23,573
	IFN- γ	-0,127	0,080	2,546	1	0,111	0,881

Capítulo V

V. Discusión

Citoquinas y consumo de alcohol:

Como se ha comentado en la Introducción, en la hepatitis alcohólica aguda existe un incremento de los niveles en sangre del TNF- α que guardan relación en muchos estudios con la endotoxemia. Recordemos que el exceso de TNF- α obedece inicialmente a la activación de las células de Kupffer por gérmenes gramnegativos de origen intestinal. En nuestro estudio, el TNF- α estaba más elevado en cirróticos que en no cirróticos, y más en cualquiera de estos dos grupos que en controles. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por la mayoría de quienes han investigado este aspecto (Bird et al, 1990), (Khoruts et al, 1991) (Hill et al, 1992), (Sheron et al, 1993), (Hill et al, 1993), (Bird et al, 1994) o (Huang et al, 1996), y en contra de lo observado por Fujimoto (Fujimoto et al, 2000) que no encuentra elevación de esta citoquina en su corta serie.

La elevación de las citoquinas proinflamatorias en alcohólicos ha sido estudiada en profundidad. Se ha concluido que, al menos en fases iniciales, hay un aumento de la producción de TNF- α por parte de las células de Kupffer, y se han analizado los tres posibles mecanismos que conducen a ello:

- 1) En primer lugar, parece que en el alcohólico existe un sobrecrecimiento bacteriano en la región distal de ileon terminal y en el colon, causante por lo tanto de un aumento absoluto de la cantidad de endotoxina que llega a la célula de Kupffer, y por eso, de una mayor producción de citoquinas proinflamatorias por parte de ésta. Avala esta hipótesis un clásico estudio experimental en el que se observó que el tratamiento antibiótico

descontaminante intestinal prevenía el desarrollo de hepatopatía etílica (Adachi et al, 1995).

2) El segundo mecanismo postulado se relaciona con un aumento de la permeabilidad a nivel intestinal causado por el alcohol o sus metabolitos. La mucosa colónica es pobre en aldehído deshidrogenasa, lo que facilita la acumulación de acetaldehído, el cual interfiere con la estructura molecular de las uniones intercelulares tipo uniones oclusivas (“tight junctions”) y adherentes, promoviendo un incremento de permeabilidad y por tanto el paso de una excesiva cantidad de endotoxina a la sangre portal (Rao, 2009). Es importante resaltar que este fenómeno es independiente de la existencia de hepatopatía, y es perfectamente congruente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde los niveles de TNF- α , aunque más elevados en cirróticos también lo estaban en alcohólicos no cirróticos; es decir, meramente el alcohol, sin necesidad de que haya cirrosis, se asocia a un aumento de TNF- α , el cual podría obedecer a una excesiva producción por parte de las células de Kupffer al ser estimuladas por la endotoxina, que llega en exceso incluso en ausencia hipertensión portal. Es evidente que cuando se desarrolla hipertensión portal, la alteración de la permeabilidad es más acusada, con lo cual no tendría nada de extrañar que sólo por este mecanismo pudiera aumentar la concentración de TNF- α en sangre, fenómeno con el que, otra vez, nuestros resultados son plenamente compatibles: el TNF- α estaba más elevado en cirróticos, resultado obtenido por la mayoría de los investigadores que han estudiado este aspecto, aunque hemos de matizar que en la mayoría de los casos la cirrosis se acompañaba de hepatitis alcohólica más o menos grave.

3) El tercero de los mecanismos estudiados para explicar el incremento de LPS en estos pacientes es la propia función de la célula de Kupffer: una última posibilidad de este incremento sería en efecto la incapacidad relativa de esta célula para aclarar esta sustancia. Como profundizaremos posteriormente, cada vez hay más indicios de que la función de la célula de Kupffer es variable a lo largo de la evolución de la enfermedad alcohólica, lo que se traduce en un cambio del perfil de citocinas. Por ejemplo, los estudios de Crews *et al*, que analizan las diferencias de los efectos de la administración de etanol en picos o de forma crónica sobre el monocito, incluyendo también la activación de los distintos TLR, demuestran que administrado en picos, el alcohol inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , pero incrementa a su vez la producción de las antiinflamatorias como la IL-10 (Crews et al, 2006). Este efecto es el contrario al observado en modelos crónicos de administración del alcohol, donde se aprecia que el monocito incrementa la producción de TNF- α y sin embargo disminuye la de IL-10. Desde luego nuestros resultados son congruentes con esta última teoría, ya que los niveles de TNF- α estaban incrementados en alcohólicos, especialmente en cirróticos –quienes en buena lógica han bebido más y durante más tiempo. Además, el TNF- α ejerce una serie de acciones deletéreas tanto sobre la propia célula de Kupffer como sobre el hepatocito e incluso en tejidos lejanos, siendo los resultados de nuestro estudio también congruentes con tal aseveración. Así, hemos encontrado una clara relación del TNF- α con las

determinaciones de función hepática, como protrombina, bilirrubina y albúmina en clara concordancia con lo que acabamos de reseñar, relacionándose también con algunos marcadores de citolisis como la LDH y reactantes de fase aguda como la ferritina. Es de destacar que el TNF- α puede ser incluso responsable del deterioro hemodinámico y de la hipertensión portal de estos pacientes (Mookerjee et al, 2003). No obstante, los ensayos terapéuticos con fármacos anti TNF no han demostrado utilidad en la hepatitis alcohólica (Spahr et al, 2002), (Tilg et al, 2003), asociándose más bien a mayor mortalidad (Naveau et al, 2004).

Hemos comentado que el TNF- α lesiona células vecinas, en primer lugar el hepatocito. Como se comentó en la introducción, este efecto se ejerce por medio de factores de transcripción nucleares, fundamentalmente el NF- $\kappa\beta$, que se activa por la unión del TNF- α a receptores celulares. Los dos principales receptores celulares son el TNFRS60s (también denominado p55) y TNFRS80s (también tipificado como p75), conocidos igualmente como receptor 1 y receptor 2. Como es sabido, una parte de estos receptores se encuentra en forma soluble en el plasma, guardando relación la intensidad de la expresión genética con los niveles plasmáticos de los mismos. Hay estudios que demuestran que la acción lesiva sobre el hígado viene dada por la activación del receptor tipo 1 (Naveau et al, 2001). En ese sentido se ha analizado el valor, como marcador de gravedad, del cociente p75/p55, observándose que está más bajo cuanto más severo es el cuadro clínico en contexto de la hepatitis alcohólica, habiéndose incluso analizado su valor pronóstico (Naveau et al, 1998).

En nuestro estudio hemos encontrado una relación inversa entre las concentraciones del TNFRS60s y los niveles de albúmina, en perfecta concordancia con lo dicho anteriormente, si bien también se ha encontrado una estrecha relación inversa entre las concentraciones plasmáticas del TNFRS80s y la albúmina. Tampoco hemos encontrado, en contraste con los resultados de Naveau *et al* de 2001, relación entre el receptor 1 y los niveles de MDA. Por eso, en nuestro estudio no encontramos una especial utilidad del cociente TNFRS60s/TNFRS80s en la evaluación clínica y pronóstica de la hepatopatía alcohólica (Naveau et al, 2001).

El efecto deletéreo del TNF- α tiene varios mecanismos que lo explican. El TNF- α se libera tras activación del TLR del macrófago, pero es que paralelamente a la inducción de la síntesis del TNF- α , otra de las consecuencias de la unión de los TLR con el LPS es el aumento de la producción de ROS (Tuma et al, 2002). Dicho aumento cierra un asa de retroalimentación positiva dentro de la propia célula de Kupffer ya que promueve la síntesis de más citoquinas por parte de estas células (Zhou et al, 2003), activa las hidrolasas macrofágicas e incluso induce la síntesis de radicales de nitrógeno activo (iNOS). Se explica así que en este estudio hayamos encontrado niveles elevados de MDA en nuestros pacientes y de nuevo, más en cirróticos que en no cirróticos, aun cuando su relación con el propio TNF- α no fuera significativa. La elevación de los productos de peroxidación lipídica, no sólo deriva en la hepatopatía alcohólica de la activación metabólica de la célula de Kupffer, sino también del desequilibrio que a la larga se produce entre esta excesiva producción (en múltiples estirpes celulares, puesto que también se ha descrito en el hepatocito y en la célula endotelial) y el

descenso de los sistemas antioxidantes. Y es que no solo la activación macrofágica es responsable del exceso de ROS y de la peroxidación lipídica. El propio metabolismo del etanol, particularmente si la inducción del sistema MEOS juega un papel relevante, como ocurre en el alcohólico crónico, induce la formación de radicales libres (Cederbaum, 1991). Por otra parte, la activación de los neutrófilos por las citoquinas liberadas por los linfocitos activados, de los que hablaremos luego, también contribuye a la producción de ROS.

Pero en la hepatopatía alcohólica no sólo existe un incremento de la producción de ROS. La peroxidación lipídica también es consecuencia de una defectuosa función de los sistemas antioxidantes, aunque los resultados obtenidos por diversos autores son dispares (Fernández-Checa et al, 1997), (Polavarapu et al, 1998), (Chen et al, 1995), (Bogdanska et al, 2005). No sólo el alcohol y especialmente el acetaldehído son capaces de bloquear la acción de la GPX, el principal sistema antioxidante celular, formando complejos (“aductos”) hemiacetal con el mismo; también se sabe que por mecanismos diversos, pero en los que influye desde luego el deficiente aporte nutricional del alcohólico crónico (Zhou et al, 2005), los niveles de oligoelementos imprescindibles para el funcionamiento de la GPX (Se y Zn) y de la SOD (Cu, Zn y Mn) están alterados. Nosotros no hemos analizado específicamente el aporte de nutrientes en estos pacientes aunque sí globalmente el estado nutricional, no habiendo encontrado relaciones entre MDA y estado nutricional. En cambio, sí que observamos que los niveles de MDA (producto de la peroxidación lipídica, pero también activo mediador de la lesión, al ser capaz de formar “aductos” con acetaldehído y otras moléculas generando compuestos altamente lesivos) estaban elevados en cirróticos más que en no cirróticos.

Otra de las interleuquinas secretadas por el macrófago, una vez activados sus TLR, es la IL-6. Nuestro estudio encuentra niveles más elevados de esta citoquina en cirróticos que en no cirróticos y controles. Además guardaban una relación con la función hepática.

La IL-6 es una citoquina con funciones aparentemente antagónicas. Por un lado es la responsable de la síntesis de la mayor parte de los reactantes de fase aguda, actuando en este sentido como proinflamatoria; la inducción de la fiebre podría enmarcarse también en este tipo de acciones (Commins et al, 2010). Pero por otra parte, induce la secreción de IL-10, la principal interleuquina antiinflamatoria. En concordancia con lo que hemos comentado, en nuestro estudio también hemos encontrado una elevación de la IL-10, más marcada en cirróticos que en no cirróticos y controles, que guarda también relación con indicadores de función hepática como albúmina y bilirrubina. Esta relación puede ser interpretada como asociada al efecto inmunorregulador de la IL-6, aunque en nuestro estudio no hubo relación entre ambos marcadores.

La interleuquina 6 es un mediador inflamatorio cuya alteración en la hepatopatía alcohólica ha sido y es interpretada de muy diversa manera. Aún cuando se piensa que puede contribuir a la lesión observada en la hepatitis alcohólica (Hill et al, 1992), (Colmenero et al, 2007) hay varias observaciones que sustentan un papel protector ejercido por esta citoquina (El-Assal et al, 2004). Es importante la observación de que la IL-6 es imprescindible para que se activen los enzimas reparadores del DNA mitocondrial, que se dañan en el alcohólico, precisamente por la

lesión oxidante. Con independencia de un balance final proinflamatorio o hepatoprotector, lo cierto es que la IL-6 estaba elevada en nuestros pacientes, en concordancia con muchos otros estudios (González-Quintela et al, 2000), (Sheron et al, 1991), (Hill et al, 1991), (González-Reimers et al, 2011). La IL-6 es una citoquina ubicua, producida también por el músculo y por el tejido adiposo, pudiéndose considerar por lo tanto como una mioquina (Pedersen et al, 2008) o como una adipoquina (Fernández-Sánchez et al, 2011). En nuestro estudio no se ha valorado de forma específica la masa muscular y grasa, si bien no se ha encontrado una correlación entre las concentraciones de IL-6 y los parámetros nutricionales estudiados. Otros autores, al menos a nivel experimental, sí han encontrado resultados positivos en ese sentido (Ling et al, 2004), algo que podría resultar paradójico a primera vista. Sin embargo, la elevación en situaciones de malnutrición y/o su relación inversa con parámetros nutricionales puede estar en relación con el efecto proinflamatorio de esta citoquina, aunque también podría interpretarse, siguiendo a El Assal et al, en un sentido compensatorio, como factor protector. Por eso, aunque hemos empleado el término paradójico, la elevación en situaciones de malnutrición y/o su relación inversa con parámetros nutricionales puede estar en relación con el efecto proinflamatorio de esta citoquina, aunque también podría interpretarse, siguiendo a El Assal *et al*, en un sentido compensatorio, como factor protector (El-Assal et al, 2004).

El LPS activa a las células de Kupffer y a los monocitos en general, promoviendo la liberación de citoquinas por parte de éstos. Sin embargo se ha observado que este efecto, muy marcado tras una primera exposición, va sufriendo un progresivo

decremento a medida que se mantiene en el tiempo. Este fenómeno se ha denominado tolerancia al LPS (Frank et al, 2004). Recordemos que el TNF- α no es la única citoquina liberada por las células macrofágicas tras estímulo de sus TLR, sino que también se liberan otras interleuquinas como la IL-12. Es conocido (Ronis et al, 2008) que la IL-12 es la principal citoquina involucrada en la activación de los linfocitos Th-1, lo que explica que en la fase iniciales de la hepatopatía alcohólica, cuando aún no se ha producido siquiera la tolerancia al LPS, predomine la secreción de citoquinas derivadas de este subgrupo celular, fundamentalmente IFN- γ . La IL-12, además de promover la proliferación y activación de las Th-1, inhibe la actividad de las Th-2. Con el tiempo, al aumentar el umbral de activación del macrófago, los niveles de IL-12 descienden, incrementándose por lo tanto la activación de los Th-2, con producción de diversas citoquinas, la más importante de las cuales es la IL-4, dado que entre otros efectos, inhibe la activación de los Th-1. Por lo tanto, el perfil de citoquinas varía a lo largo de la historia natural de la hepatopatía alcohólica. Esto podría ponerse en evidencia en un estudio longitudinal observacional de enfermos que comenzaran a beber. Como es obvio, este tipo de estudio sería irrealizable de forma prospectiva, ya que contraviene cualquier principio ético (Ronis et al, 2008). En concordancia con el cambio de patrón de citoquinas a lo largo del tiempo, los resultados de algunos estudios sugieren que el predominio de secreción Th-1 en la fase temprana de la hepatopatía alcohólica se asocia a esteatosis, siendo el incremento de secreción de IL-4 el que marca la evolución hacia el progresivo depósito de fibrosis que define las fases avanzadas de la

hepatopatía alcohólica. Este efecto, como comentamos en la introducción, puede obedecer a la secreción del TGF- β inducido por esta citoquina (Scholten et al, 2011).

En la mayoría de trabajos realizados en pacientes alcohólicos los resultados obtenidos reflejan lo encontrado en una población más o menos amplia, pero heterogénea en lo que respecta al tiempo de duración del hábito etílico y a la dosis de alcohol a la que estaba expuesta. Eso explica en parte la variabilidad de resultados (González-Quintela et al, 2007), (Laso et al, 2007), (Sánchez-Pérez et al, 2006), (Naveau et al, 2005), (Frank et al, 2004), (González-Quintela et al, 2000), (Fujimoto et al, 2000), ya que la elevación más o menos pronunciada de una u otra citoquina puede depender del estadio evolutivo. En la presente serie la mayor parte de los enfermos había estado expuesta a dosis excesivas de alcohol durante largos años. Tal vez por eso hayamos encontrado elevación de las dos principales citoquinas secretadas por cada una de las dos estirpes de linfocitos CD4, IFN- γ e IL-4. Ambas interleuquinas estaban más elevadas en los pacientes cirróticos que en los no cirróticos y que en los controles, siendo especialmente manifiestas las diferencias observadas con el IFN- γ . Sin embargo, las relaciones de ambas citoquinas con la función hepática no resultaron significativas, observando en cambio una relación inversa de ambos con marcadores de citolisis, lo que pudiera sugerir que la activación de la respuesta inmune controla la intensidad de la lesión celular, provocando menor citolisis.

Otra citoquina liberada por las células Th-2 es la IL-13, que comparte muchas de las funciones de la IL-4, especialmente el cambio de isotipo de inmunoglobulina y ciertos efectos sistémicos (Hershey et al, 2003). De forma paralela a como ocurría con la IL-4, en nuestro estudio la IL-13 está elevada pero sólo en

pacientes cirróticos. Este hallazgo concuerda con lo que mencionamos previamente referente al cambio de predominio de población linfocitaria en la evolución de la hepatopatía clínica: sólo en las fases avanzadas de la enfermedad está realmente activada la producción de citoquinas Th-2.

Evolución de las citoquinas en el tiempo.

No hay un acuerdo general en lo referente a la duración de la elevación de los niveles de citoquinas en sangre después de una exposición crónica al alcohol. Algunos estudios (González-Quintela et al, 2000) sugieren que a los 15 días de abstinencia hay un descenso drástico de la secreción de interleuquinas. En cambio, Eggers *et al* en 2006, refiere niveles de TNF- α aún detectables incluso tres años y medio después de la abstinencia (Eggers et al, 2006). Un resultado parecido es el referido por el grupo de Crews *et al*, relativo a la persistencia de niveles de citoquinas en el cerebro, demostrando que incluso diez meses después de la abstinencia existen aún niveles cerebrales suficientes para generar lesión celular (Crews et al, 2006), (Quin et al, 2007). Otros estudios, tanto en humanos como en modelos murinos de alcoholismo, encuentran persistencia de cifras elevadas de TNF- α en pulmón y relacionan este hallazgo con la mayor duración y severidad de la neumonía en estos sujetos, favorecida esta evolución por el edema asociado al exceso de TNF- α producido por los macrófagos alveolares en respuesta a los altos niveles circulantes tras la estimulación de las células de Kupffer (Fukui, 2005).

Lo cierto es que como vemos, hay discordancia en lo que respecta a la duración de la alteración de los niveles de citoquinas en sangre, motivo por el uno de los objetivos de este estudio fue determinar el cambio de las concentraciones séricas de estas citoquinas seis meses después, considerando el factor abstinencia. Obviamente, a todos nuestros pacientes les recomendamos abstinencia absoluta de alcohol y cambios en el estilo de vida, pero no todos lo hicieron, incluso ni siquiera aquellos que habían accedido a repetirse el estudio seis meses después. Esta realidad, lamentable, nos permitió, por otra parte, tener dos grupos de pacientes: los que se mantuvieron abstinentes y los que no lo hicieron. Es difícil asegurarse de que realmente un paciente con consumo previo de grandes cantidades de alcohol observa abstinencia. No obstante, hemos recurrido al empleo de marcadores bioquímicos (clásicos) de consumo de etanol, como GGT y VCM, y a interrogar de forma repetida a los pacientes y a sus familiares, por lo que consideramos que hay una garantía en cuanto a poderlos clasificar como abstinentes o no abstinentes en esta segunda evaluación.

A los seis meses, aun cuando se observa una tendencia de todas las citoquinas estudiadas a permanecer elevadas en relación a los controles, realmente sólo con respecto al IFN- γ y el MALD encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles. Es decir, en nuestra serie, a los seis meses, los niveles de citoquinas se han normalizado excepto los de IFN- γ , que permanecen elevados. Recordemos que la segunda evaluación, a los seis meses, no se realiza en pacientes ingresados, por lo que en principio está excluida cualquier eventualidad de tipo infeccioso/inflamatorio que pudiera estar jugando un papel en esta elevación. Debemos señalar que la determinación basal de citoquinas no fue al inicio del ingreso del paciente sino cuando éste estaba estable y próximo al alta, por lo que también en la determinación inicial, la

influencia de factores coyunturales de tipo inflamatorio/infeccioso no debe jugar un gran papel. Este resultado sugiere por lo tanto, una persistencia de la actividad inflamatoria (al menos de la actividad Th-1) en nuestros enfermos, independiente de la situación clínica. Hemos de resaltar que las diferencias de IFN- γ se encuentran tanto entre los que hacen abstinencia como en los que no, es decir, que su elevación no depende de una nueva ingesta alcohólica, al menos en nuestro estudio. Lo mismo le ocurre con los niveles de MDA, que están elevados tanto en abstinentes como no abstinentes –lo que también podría indicar que la secreción de citocinas no es un fenómeno inocuo, sino capaz de seguir generando peroxidación lipídica. Es de interés también resaltar que en los que continúan bebiendo también está elevada la IL-8, otra citoquina proinflamatoria, lo cual, interpretado en el contexto del carácter ambulatorio de esta segunda cita sugiere fuertemente que el alcohol *per se* juega un papel como factor proinflamatorio de baja intensidad.

Como expusimos en los resultados, realizamos un análisis tipo modelo lineal general para medidas repetidas, con el objetivo primordial de analizar si el factor abstinencia modificaba el comportamiento de las citoquinas. Como puede comprobarse, todas las citoquinas salvo el IFN- γ y la IL-6 disminuyen en esta segunda determinación. La IL-6 aumenta, aun cuando al igual que ocurriera con los valores basales, no hay diferencias significativas con los controles. La IL-6 es una citoquina ubicua, producida también por el tejido adiposo, especialmente el tejido adiposo abdominal. En un estudio previo de nuestro grupo comprobamos que la IL-6 guardaba relación con la masa grasa (González-Reimers et al, 2009). Recientemente se ha

sugerido que la elevación de IL-6, más que deletérea es protectora en la hepatopatía alcohólica; parece ser que es un mediador esencial en la reparación del daño ejercido por el alcohol sobre el DNA mitocondrial (Zhang et al, 2010). Así, para explicar su elevación en la hepatopatía alcohólica, se ha postulado que ésta es compensatoria.

En cambio no encontramos variaciones en el TNF- α , a diferencia de lo observado por Crews *et al* que sugieren su persistencia, al menos en tejido cerebral, como mínimo durante diez meses (Crews et al, 2006). Los resultados relativos a la IL-6 deben interpretarse en el mismo contexto que lo encontrado con el IFN- γ : es decir, parece que en el alcohólico persiste un cierto grado de actividad inflamatoria que está acompañado de un incremento de la IL-6, que, a la luz de la más reciente investigación, puede ser para compensar un efecto deletéreo. A favor de la persistencia de la actividad inflamatoria hay que resaltar también el hallazgo de un incremento de la IL-8 en aquellos pacientes que continuaban bebiendo en la segunda evaluación. Como se comentó, la IL-8 es una quimiocina cuya principal función es atraer a células neutrofílicas, una vez activada por las citoquinas proinflamatorias (Zimmermann et al, 2011). La elevación de la IL-8 en la hepatopatía alcohólica ha sido también encontrada por muchos autores (Sheron et al, 1993), (Huang et al, 1996), (Swiatkowska-Stodulska, 2006), en clara relación con el deterioro de la función hepática e incluso con alteraciones histológicas, como el infiltrado neutrofílico. Por eso nuestros resultados, con una elevación mayor en cirróticos que en no cirróticos, y una relación directa con protrombina, albúmina, bilirrubina, o presencia de encefalopatía y/o ascitis, e incluso mortalidad a largo plazo, son plenamente congruentes con la literatura.

Que sepamos, no existe otro estudio donde se haya valorado el efecto de la abstinencia sobre el perfil de citoquinas, pero a la luz de nuestros resultados podría colegirse que efectivamente, a largo plazo, en el alcohólico, aún sin consumir más etanol, persiste un cierto grado de actividad inflamatoria, que, al no presentar diferencias entre cirróticos y no cirróticos, sugiere una independencia del estadio de la hepatopatía. A pesar de todo no puede descartarse que persistiera en el hígado de estos enfermos cierto grado de fibrosis y de actividad histológica, responsable de la alteración descrita en los niveles de citoquinas.

Mortalidad

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue analizar el valor pronóstico de las citoquinas, tanto el de los niveles basales durante el ingreso hospitalario como el del cambio en las concentraciones de estas biomoléculas sufrido a los seis meses.

De las interleuquinas analizadas, la IL-6 guardaba claramente valor pronóstico, lo que concuerda con las diferencias encontradas entre cirróticos y no cirróticos y con la relación observada con los parámetros de función hepática. No obstante, en un análisis de regresión de Cox, se observa que el valor pronóstico de esta citoquina queda claramente desplazado por los parámetros de función hepática.

Al hilo de lo que comentábamos anteriormente es interesante reseñar que el cambio en los valores de TNF- α (más elevados en una segunda evaluación que en la

primera) se relacione con el pronóstico, avalando lo que comentábamos previamente en relación con la persistencia de la actividad inflamatoria en estos pacientes.

Es destacable también que guarde relación con el pronóstico la disminución del IFN- γ . Previamente señalamos que las citoquinas derivadas de los linfocitos Th-1 disminuyen a lo largo de la evolución de la hepatopatía, asociándose su elevación a las fases tempranas de la lesión hepática. Por lo tanto, nuestro resultado, interpretado conjuntamente con el valor pronóstico de los niveles de IL-4 iniciales es compatible con esta teoría ya apuntada por Crews en su clásica revisión: en las fases tempranas de la hepatopatía, el IFN- γ está elevado, pero luego desciende a medida que la enfermedad evoluciona. En cambio, en caso de las citoquinas derivadas de los Th-2, se relacionan más con fibrosis y fases más avanzadas de la hepatopatía, por lo que no es el descenso de sus concentraciones, sino su elevación, lo que se relaciona con el pronóstico –aunque, como ocurría con la IL-6, estos marcadores quedan desplazados por las variables clásicas de función hepática en una regresión de Cox.

Capítulo VI

VI. Conclusiones

1. En los pacientes alcohólicos encontramos una elevación inicial de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6 y de la quimiocina IL-8) en relación con la función hepática. Todo ello se acompaña de un incremento en los marcadores de peroxidación lipídica.
2. En los alcohólicos se elevan tanto las citoquinas derivadas de la activación de las células Th-1 (IFN- γ) como de las células Th-2 (IL-13 e IL-4). Los niveles de estas dos últimas guardan relación con la función hepática.
3. Los niveles basales de IL-4, IL-6 e IL-8 se relacionan con el pronóstico, aun cuando son desplazados por parámetros de función hepática en una regresión de Cox.
4. A los seis meses continúan elevados los niveles de IFN- γ y los marcadores de peroxidación lipídica en todos los pacientes, incluyendo aquellos que observan abstinencia, lo que sugiere la persistencia de un estado proinflamatorio, de bajo grado.
5. En aquellos alcohólicos que siguen bebiendo se observa además un incremento de la IL-8, lo que abunda en lo referido anteriormente.

6. La elevación del TNF- α y el descenso de los niveles IFN- γ guardan relación con el pronóstico, pudiendo interpretarse el primero como expresión del estado proinflamatorio continuado y el segundo como expresión del descenso de la respuesta Th-1 a medida que progresa la enfermedad hepática.

Bibliografía

- Adachi et al. (1995). Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*, 218-224.
- Adams et al. (1984). Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am*, 179-200.
- Anttinen et al. (1984). Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride-injured and normal growing rats upon administration of zinc. *Gastroenterology*, 532-539.
- Ara et al. (2010). Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur. J. Cancer*, 1223-1231.
- Arthur et al. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, G245-249.
- Baraona et al. (1977). Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. *J Clin Invest*, 546-554.
- Barbieri et al. (2002). Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 481-487.
- Basuroy et al. (2005). Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and L-glutamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, G367-375.
- Bazan, J. (1993). Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol*, 603-606.

- Beeson, P. (1946). Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med*, 248-250.
- Beg et al. (1995). Constitutive NF-kappaB activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha deficient mice. . *Genes Dev*, 2736-2746.
- Bird et al. (1990). Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med*, 917-920.
- Bird et al. (1994). Interleukin-8 in alcoholic liver disease. *Acta Gastroenterol Belg*, 255-259.
- Bode et al. (2003). Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 575-593.
- Bogdanska et al. (2005). Erythrocyte antioxidant enzymes in patients with alcohol dependence syndrome. *Bratisl Lek Listy*, 107-113.
- Carter et al. (1987). Barrier defense function of the small intestine: effect of ethanol and acute burn trauma. *Adv Exp Med Biol*, 829-833.
- Cederbaum et al. (2009). Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol*, 519-548.
- Cederbaum, A. (1991). Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol Suppl*, 291-296.

Chen et al. (1995). Liver antioxidant defenses in mice fed ethanol and the AIN-76A diet. *Alcohol*, 453-457.

Colmenero et al. (2007). Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology*, 687-697.

Commins et al. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*, 1108-1111.

Commins et al. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol*, S53-72.

Crews et al. (2006). Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 720-730.

Donohue et al. (2007). Role of the proteasome in ethanol-induced liver pathology. *Alcohol Clin Exp Res*, 1446-1459.

Drucker et al. (2009). Impact of interleukin-6 classic and trans.signaling on liver damage and regeneration. *Jouranl of Autoimmunity*, 29-37.

Eggers et al. (2006). Immune reactivity is more suppressed in patients with alcoholic liver disease than in patients with virus-induced cirrhosis after CRH stimulation. *Alcohol Clin Exp res*, 140-149.

El-Assal et al. (2004). IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell Moll Immunol*, 205-211.

- Fernandes et al. (2010). Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. *Braz Med Biol Res*, 860-868.
- Fernández-Checa et al. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol*, G7-17.
- Fernández-Sánchez et al. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*, 3117-3132.
- Foell et al. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.*, 28-35.
- Folco et al. (2009). Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J Biol Chem.*, 25569-25575.
- Fontaine et al. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*, 1-7.
- Frank et al. (2004). Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. *Alcohol Alcohol*, 386-392.
- Fujimoto et al. (2000). Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol Clin Exp Res*, 48S-54S.

- Fujimoto et al. (2000). Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol Clin. Exp. Res*, 48S-54S.
- Fukui, H. (2005). Relation of endotoxin, endotoxin binding proteins and macrophages to severe alcoholic liver injury and multiple organ failure. *Alcohol Clin Exp Res*, 172-179.
- González-Quintela et al. (2000). Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine*, 1437-1440.
- González-Quintela et al. (2000). Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine*, 1437-1440.
- González-Quintela et al. (2007). Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumption. *Cytokine*, 54-60.
- González-Reimers et al. (2005). Alcoholic myopathy: lack of effect of zinc supplementation. *Food Chem Toxicol*, 1333-1343.
- González-Reimers et al. (2005). Effect of zinc supplementation on ethanol-mediated bone alterations. *Food Chem Toxicol*, 1497-1505.
- González-Reimers et al. (2009). Relation between body fat and liver fat accumulation and cytokine pattern in non-alcoholic patients with chronic HCV infection. *Ann Nutr Metab*, 351-357.

- González-Reimers et al. (2011). Interleukin-15 and other myokines in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol*, 529-533.
- Goronzy et al. (2008). The Innate and Adaptive Immune System. In L. Goldman, & D. Ausiello, *Cecil Medicine* (p. 253). Philadelphia: Saunders-Elsevier.
- Grell et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 793-802.
- Gutiérrez et al. (2004). Interleucina, quimiocinas y otras citocinas que intervienen en las respuestas inmunitarias e inflamatorias. In C. Rozman, *Farreras-Rozman. Medicina Interna* (pp. 2754-2755). Barcelona: Elsevier.
- Hage et al. (1999). Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface. *Cell* , 271-281.
- Halsted et al. (1973). Distribution of ethanol in the human gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, 831-834.
- Hershey et al. (2003). IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*, 677-690.
- Hill et al. (1991). Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest*, 811-816.
- Hill et al. (1992). Identification of tumor necrosis factor as a transcriptional regulator of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene following endotoxin treatment of mice. *Infect Immun*, 4040-4050.

Hill et al. (1992). Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J. Lab. Clin. Med*, 547-552.

Hill et al. (1993). Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* , 576-580.

Ho et al. (2008). Lipopolysaccharide-induced expression of matrix metalloproteinases in human monocytes is suppressed by IFN-gamma via superinduction of ATF-3 and suppression of AP-1. *J Immunol.*, 5089-5097.

Hoene et al. (2010). The stress response of the liver to physical exercise. *Exerc Immunol Rev.*, 163-183.

Homann et al. (1997). High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis*, 1739-1743.

Hu et al. (2009). Cross-regulation of Signaling and immune Responses by IFN-g and STAT1. *Immunity*, 539-550.

Huang et al. (1996). Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J. Hepatol*, 377-384.

Juan Carlos I. (2003, julio 11). LEY 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y y del Vino. *Boletín Oficial del Estado*, 27165-27179.

Kang et al. (2005). Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med*, 391-404.

- Keshavarzian et al. (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatology*, 538-547.
- Khoruts et al. (1991). Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology*, 267-276.
- Kikugawa et al. (1992). Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal Biochem*, 249-255.
- Kitchens et al. (2001). Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*, 485-493.
- Knall et al. (1997). Interleukin-8 stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 3052-3057.
- Kono et al. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunology*, 279-289.
- Landry et al. (2001). The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.*, 588-595.
- Langrish et al. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 96-105.

- Laso et al. (2007). Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytometry B Clin Cytom*, 408-415.
- Lauw et al. (2000). Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. *J Infect Dis* , 206-213.
- Lee et al. (2004). Abnormal hepatic methionine and glutathione metabolism in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*, 173-181.
- Lieber, C. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, 9-19.
- Ling et al. (2004). Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *Am J Physiol*, R801-808.
- Ling et al. (2004). Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 801-808.
- Lucey, M. (2009). Management of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*, 267-275.
- Lyakh et al. (2008). Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the Thelper. *Immunol Rev.*, 112-131.
- Mandal et al. (2010). Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: role of an adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1 pathway. *World J Gastroenterol.*, 1330-1336.

- Marnett, L. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* , 83-95.
- Martinon, F. (2010). Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunol Rev*, 218-232.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 301-305.
- McLoughlin et al. (2000). Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Leukoc Biol*, 5676-5683.
- Mookerjee et al. (2003). Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut*, 1182-1187.
- Moriguchi et al. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J.* , 7045-7053.
- Mosser et al. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 205-218.
- Naka et al. (2001). SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity*, 535-545.
- Naveau et al. (1998). Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 in patients with alcoholic liver disease of increasing severity. *J Hepatol*, 778-784.

Naveau et al. (2001). Tumor necrosis factor soluble receptor p55 and lipid peroxidation in patients with acute alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol*, 3361-3367.

Naveau et al. (2004). A doubleblind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1390-1397.

Naveau et al. (2004). A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1390-1397.

Naveau et al. (2005). Balance between pro and anti-inflammatory cytokines in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol*, 269-274.

O'Shea et al. (2010). Alcoholic liver disease. *Hepatology* , 307-328.

Park et al. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 1191-1195.

Parlesak et al. (2000). Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J. Hepatol*, 742-747.

Pedersen et al. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 1379-1406.

Pessayre et al. (1999). Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol*, 367-373.

Peters et al. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*, 495-504.

- Polavarapu et al. (1998). Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*, 1317-1323.
- Powers et al. (1993). The high-resolution, three-dimensional solution structure of human interleukin-4 determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 6744-6762.
- Pugh et al. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 646-649.
- Quin et al. (2007). Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 453-462.
- Rao et al. (2004). Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, G881-884.
- Rao, R. (2009). Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 638-644.
- Rondione, C. (2006). Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*, 81-90.
- Ronis et al. (2008). Cytokine and chemokine expression associated with steatohepatitis and hepatocyte proliferation in rats fed ethanol via total enteral nutrition. *Exp Biol Med (Maywood)*, 344-355.

- Roychowdhury et al. (2009). Formation of gamma-ketoaldehyde-protein adducts during ethanol-induced liver injury in mice. *Free Radic Biol Med*, 1526-1538.
- Sánchez-Pérez et al. (2006). Lipid peroxidation and serum cytokines in acute alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol*, 593-597.
- Santolaria et al. (2000). Osteopenia assessed by body composition analysis is related to malnutrition in alcoholic patients. *Alcohol*, 147-157.
- Scholten et al. (2011). Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury. *Am J Pathol*, 189-198.
- Schroder et al. (2006). Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 511-524.
- Scott et al. (2010). Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons,. *J Allergy Clin Immunol*, 53-72.
- Secades et al. (2010). Course of alcohol withdrawal syndrome in a general hospital. *Adicciones*, 141-146.
- Sheron et al. (1991). Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 449-453.
- Sheron et al. (1993). Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology*, 41-46.
- Spahr et al. (2002). Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study. *J. Hepatol*, 448-455.

- Suárez-Santamaría et al. (2010). Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *Eur Cytokine Netw*, 19-26.
- Süfke et al. (2009). Continuous analysis of heart rate variability for examination of cardiac autonomic nervous system after alcohol intoxication. . *Med Klin (Munich)*., 511-519.
- Swiatkowska-Stodulska. (2006). Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit*, CR215-220.
- Takeuchi et al. (2010). Pattern recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 805-820.
- Taylor, P. (2001). Anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Mol Biotechnol*, 153-168.
- Tilg et al. (2003). Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol*, 419-425.
- Tuma et al. (2002). Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med*, 303-308.
- Wajant et al. (2003). Tumor necrosis signaling. *Cell Death and Differentiation*, 45-65.
- Waugh et al. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*, 6735-6741.
- Wilson et al. (2010). Inflammasome-mediated autoinflammatory disorders. *Postgrad Med* , 125-133.

- You et al. (2009). Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* (Maywood), 850-859.
- Zetterman et al. (1981). Immunologic aspects of alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 616-624.
- Zhang et al. (2010). Interleukin-6 is an important mediator for mitochondrial DNA repair after alcoholic liver injury in mice. *Hepatology*, 2137-2147.
- Zhou et al. (2003). A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. *Am J Pathol*, 1137-1146.
- Zhou et al. (2005). Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 391-404.
- Zimmermann et al. (2011). Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*, e21381.