

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS.
EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA
Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

Emilio Sacanella Meseguer.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700920282

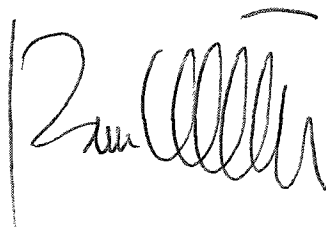


RAMÓN ESTRUCH RIBA, Profesor Asociado de Medicina de la
Universidad de Barcelona,

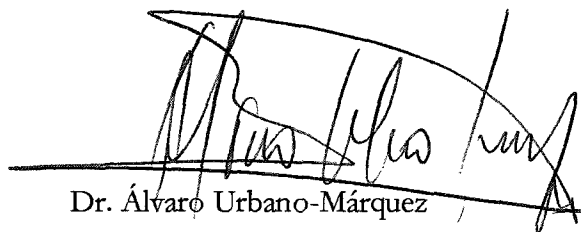
y

ÁLVARO URBANO-MÁRQUEZ, Catedrático de Patología General de la Universidad de
Barcelona y Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFICAMOS que la memoria titulada **"EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES
ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN
LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN"** presentada por Emilio Sacanella
Meseguer, ha sido realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones
necesarias para ser defendida delante del Tribunal correspondiente para optar al Grado de
Doctor en Medicina y Cirugía.



Dr. Ramón Estruch Riba



Dr. Álvaro Urbano-Márquez

BARCELONA, Junio de mil novecientos noventa y nueve.

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

A mis padres.

A Marisa e Ignasi, por todo.

Agradecimientos

Los trabajos que forman parte de esta memoria no se podrían haber llevado a cabo sin la valiosa colaboración de numerosas personas que tanto de una manera personal como profesional han influido en su realización. Entre ellas quiero mostrar mi agradecimiento especial a:

Dr. Ramón Estruch Riba, director de esta tesis, maestro, compañero, y amigo por transmitirme su constante interés en el estudio de los pacientes alcohólicos y por la confianza depositada en mi para realizar la presente tesis.

Prof. Álvaro Urbano-Márquez, co-director de esta tesis, Jefe del Servicio de Medicina Interna y Catedrático de Patología General por su constante estímulo en la búsqueda de respuestas a los problemas asociados al alcoholismo crónico.

Dr. Joaquim Fernández-Solá compañero y amigo por su inestimable colaboración y ayuda en la selección de pacientes alcohólicos.

Sr. Mohamed Khalil y al Sr. Juanjo Barceló por su valiosa ayuda técnica en los procedimientos de laboratorio empleados.

Finalmente, a los compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínic y a los pacientes incluidos por su colaboración constante y desinteresada.

PUBLICACIONES

Esta memoria se basa en los siguientes artículos:

1. E. Sacanella, R. Estruch, A. Gayà, J. Fernández-Solá, E. Antúnez, A. Urbano-Márquez.
"Activated lymphocytes (CD69⁺, CD25⁺ cells) and decreased CD19⁺ cells in well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases".
Alcoholism Clinical and Experimental Research 22:897-901, 1998.
2. E. Sacanella, R. Estruch, A. Gayà, K. Ferrer, J. Fernández-Solá, JR. Alonso, JM. Nicolás, A. Urbano-Márquez.
"Up-regulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases".
Alcoholism Clinical and Experimental Research 22:371-375, 1999.
3. E. Sacanella, R. Estruch, E. Badía, J. Fernández-Solá, JM. Nicolás, A. Urbano-Márquez.
"Chronic alcohol consumption increases serum levels of circulating endothelial cell/leucocyte adhesion molecules E-selectin and ICAM-1".
Alcohol and Alcoholism (en prensa, 1999).

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

Esta Tesis ha sido subvencionada con las siguientes ayudas:

Beca de Investigación del Hospital Clínic para el año 1993.

Beca del Fondo Investigación Sanitaria (94/1114).

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

INDICE GENERAL

I PARTE TEÓRICA.....	10
1. Introducción.....	11
2. Patogenia de las alteraciones inmunológicas detectadas en el alcoholismo crónico.....	13
2.1. Efecto del alcohol y sus metabolitos.....	13
2.1.1. Efecto del alcohol sobre la membrana celular.....	13
2.1.2. Efecto del alcohol en los mecanismos de transducción de señales.....	15
2.1.3. Efectos metabólicos del alcohol y radicales libres.....	17
2.2. Factores nutricionales.....	19
2.3. Factores genéticos.....	22
3. Efecto del alcohol sobre el sistema inmune. Evidencias experimentales.....	22
3.1. Efectos cuantitativos del alcohol sobre las células inmunes.....	23
3.2. Efectos cualitativos del alcohol sobre las células inmunes.....	23
3.2.1. Linfocitos T.....	23
3.2.2. Células NK.....	24
3.2.3. Polimorfonucleares neutrófilos.....	24
3.2.4. Monocitos/Macrófagos.....	25
3.3. Efecto del alcohol en la migración de células inmunes y en la expresión de moléculas de adhesión.....	26
3.4. Efecto del alcohol en la regulación del sistema inmune.....	27
3.4.1 Efecto del alcohol en las interacciones entre linfocitos y monocitos.....	27
3.4.2. Efecto del alcohol sobre la respuesta inmunitaria TH1/TH2	28
3.4.3. Interacciones del alcohol y citokinas.....	29

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

4. El sistema inmune en enfermedades con elevada prevalencia en alcohólicos crónicos.....	31
4.1. Enfermedades asociadas a déficit inmune.....	31
4.1.1. Neumonía.....	31
4.1.2. Tuberculosis.....	32
4.1.3. Infección por el VIH.....	33
4.1.4. Infección por el virus de la hepatitis C.....	34
4.1.5. Cáncer.....	34
4.2. Enfermedades con componente autoinmune.....	35
4.2.1. Hepatopatía alcohólica.....	35
4.2.2. Otras.....	37
5. Anomalías del sistema inmune observadas en alcohólicos crónicos.....	38
5.1 Elevación de inmunoglobulinas y depósito tisular.....	38
5.2 Inmunidad celular.....	39
5.3 Alteraciones de subpoblaciones linfocitarias y activación persistente.....	40
5.4. Otras anomalías en el sistema inmune de los alcohólicos.....	42
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
1. Hipótesis de trabajo.....	44
2. Objetivos.....	46
III TRABAJOS.....	48
TRABAJO 1: Linfocitos activados (células CD25 ⁺ CD69 ⁺) y descenso de subpoblación CD19 ⁺ en alcohólicos crónicos bien nutridos y sin patología asociada al alcoholismo crónico.....	49

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

TRABAJO 2:	Hiperexpresión de moléculas VLA y CD29 en linfocitos de sangre periférica de pacientes alcohólicos crónicos sin patología asociada al alcoholismo crónico.....	50
TRABAJO 3:	El consumo crónico de alcohol incrementa las concentraciones séricas de moléculas de adhesión solubles endoteliales/ leucocitarias E-selectina e ICAM-1.....	51
IV DISCUSIÓN CONJUNTA.....		52
V CONCLUSIONES.....		61
VI BIBLIOGRAFÍA.....		66

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

I PARTE TEÓRICA

1. INTRODUCCIÓN

El alcoholismo crónico es un problema sanitario de primer orden en el mundo occidental y condiciona un elevado gasto tanto en su vertiente de problemática social como en la estrictamente sanitaria. A pesar de que un gran número de variables genéticas, biológicas, psicológicas y socioculturales han mostrado relación con esta enfermedad, no se ha aclarado totalmente su patogenia, diagnóstico y tratamiento.

Es conocido que el abuso crónico de alcohol tiene un efecto pernicioso sobre diferentes órganos y sistemas de la economía. De esta forma, está bien descrita el desarrollo de miocardiopatía, hepatopatía, lesiones en el sistema nervioso central, neuropatía periférica y miopatía esquelética en pacientes alcohólicos crónicos (1-4). Más recientemente, diversos estudios epidemiológicos y clínicos han relacionado el alcoholismo crónico con una mayor prevalencia de enfermedades infecciosas, especialmente neumonías adquiridas en la comunidad, y neoplasias, sobretodo del árbol respiratorio y tracto digestivo superior (5-7). Esta mayor susceptibilidad a sufrir determinadas infecciones o neoplasias se ha considerado que podía deberse a un estado de inmunodeficiencia producida por el abuso crónico de alcohol (6,8-10). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que algunas de las complicaciones asociadas al alcoholismo crónico, especialmente la hepatopatía alcohólica, podría parcialmente estar causada o exacerbada por fenómenos de autoinmunidad desencadenado por el abuso de alcohol (11-15).

En los últimos años se han publicado múltiples trabajos experimentales y clínicos que estudian diferentes aspectos de la inmunidad humoral y celular en animales alimentados con etanol o en alcohólicos crónicos, sin embargo, en muchas ocasiones los

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

resultados obtenidos son contradictorios. Esto puede ser debido, al menos parcialmente, a que el alcoholismo crónico se encuentra frecuentemente asociado a otros factores que por si mismos pueden afectar al sistema inmunitario. Estos factores fundamentalmente son la desnutrición, la coexistencia de hepatopatía, el tabaquismo y la infección por el virus de la hepatitis C. En la mayoría de los estudios publicados estos factores coadyuvantes en el desarrollo de disfunción inmunológica en los alcohólicos crónicos no son tenidos en cuenta. Debido a ello, la población analizada en los diferentes trabajos es heterogénea y puede hacer difícil discernir si las anomalías detectadas en el sistema inmunitario de esos pacientes es debida al abuso continuado de alcohol, a la existencia de los cofactores mencionados o a una mezcla de ambas situaciones.

El objetivo principal de este proyecto es evaluar si los pacientes alcohólicos crónicos en los que se ha descartado la existencia de patología asociada (esencialmente hepatopatía alcohólica y malnutrición) presentan alteraciones en diversos parámetros del sistema inmunitario comparados con un grupo de controles sanos no consumidores de etanol. En caso de ser así, podremos demostrar que el abuso crónico de etanol per se es capaz de producir disfunción inmunológica independientemente de la existencia de malnutrición, hepatopatía u otros factores asociados al alcoholismo crónico.

2. PATOGENIA DE LAS ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DETECTADAS EN EL ALCOHOLISMO CRÓNICO.

El mecanismo patogénico a través del cual el abuso crónico de etanol induce lesión celular en cualquier tejido del organismo no es bien conocido, ni tampoco en las células del sistema inmunitario. Probablemente no existe un único mecanismo responsable de la lesión celular sino una combinación de varios de ellos. En general, se consideran como hipótesis más probables: a) efectos tóxicos directos o indirectos del alcohol y/o sus metabolitos sobre la célula, b) factores nutricionales y c) una predisposición individual determinada genéticamente.

2.1. Efecto del alcohol y sus metabolitos.

2.1.1. Efecto del alcohol sobre las membranas celulares.

El alcohol etílico tiene un efecto directo sobre las membranas celulares que está relacionado con su liposolubilidad (16). Singer y Nicolson demostraron que las membranas celulares están formadas por una bicapa lipídica que sirve de esqueleto a las proteínas que están unidas a la membrana. Estas proteínas tienen una actividad biológica significativa al actuar como receptores, enzimas o canales iónicos por lo que cambios en el estado de fluidez normal de la membrana pueden alterar la orientación o conformación de las glicoproteínas y glicolípidos ancladas a ella y de este modo alterar su función. In vitro, se ha demostrado que la exposición aguda al etanol aumenta la fluidez de las membranas biológicas (17), mientras que la exposición crónica disminuye la fluidez de las mismas (son más rígidas), esta "rigidez" es reversible si las células se incuban de nuevo con etanol. Por otro lado, existe un fenómeno de tolerancia en las membranas celulares de muchos tejidos de modo que los animales alcoholizados son

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

más resistentes a la acción del etanol sobre las membranas. Este fenómeno de tolerancia al alcohol se debe principalmente a un cambio en la composición de fosfolípidos (cardiolipina, fosfatidil inositol) o a un incremento del colesterol en las membranas celulares (18). Estos cambios en la fluidez de la membrana inducida por la exposición al etanol se recuperan tras una semana sin exposición al mismo.

Existen diversos ejemplos que demuestran que el alcohol in vivo e in vitro puede modificar los componentes (proteínas y lípidos) de la membrana de los linfocitos y que de ello puede derivarse cambios funcionales significativos (19,20). Así, en linfocitos de alcohólicos con hepatopatía y de controles no bebedores incubados con etanol se ha observado un reordenamiento de la molécula CD45 (glicoproteína) que de esta forma tiende a expresar preferentemente isoformas de alto peso molecular (CD45RA) en lugar de las de bajo peso molecular (CD45RO). Estos cambios fenotípicos coinciden con una deficiente respuesta proliferativa de esos linfocitos tras la estimulación con anti-CD2 y anti-CD3. Se ha atribuido este hecho a que, tras la activación, los linfocitos que expresan CD45RA (células vírgenes) no consiguen agrupar en la membrana esta molécula conjuntamente con CD4 y CD3 y ello implicaría que la transducción de señales fuera menos eficiente en las células CD45RA⁺ que en las CD45RO⁺ las cuales si agrupan las tres moléculas referidas tras la activación celular. Estos cambios fenotípicos y funcionales regresan tras 6 meses de abstinencia alcohólica (20). Asimismo, también se ha detectado que el etanol de forma aguda in vitro impide el incremento en la expresión y función de algunos antígenos de activación (CD26) pero no de otros (CD25, y CD71) en linfocitos T CD4⁺ estimulados con lectinas o anti-CD3 (21) y que la disfunción de la adenilciclase en linfocitos en respuesta a la exposición aguda

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

(incrementa la actividad) o crónica (disminuye) al etanol se debe a un efecto directo sobre la membrana celular (22,23). Por último, se ha demostrado que el abuso crónico de etanol induce cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana linfocitaria en alcohólicos (reducción de ácidos grasos insaturados) tanto en situación basal como tras estimulación con anti-CD3 y ello puede ser responsable de la generación de diacilglicerol modificado y de este modo inducir la activación de proteinkinasa C por una vía alternativa (19).

2.1.2 Efecto del alcohol sobre los mecanismos de transducción de señales.

La interacción de un agente químico con una célula puede inducir diversos cambios a nivel molecular que condicionarán su respuesta. Inicialmente, el agente se une a un receptor de membrana, lo que desencadena una serie de respuestas intracelulares que alcanzan el núcleo celular (factores de transcripción nuclear) donde se generará ARNm (proceso de transcripción) y en base a éste se producirá una proteína (proceso de traducción) que tendrá efecto en el interior de la célula o en otras vecinas. No se ha podido demostrar que el etanol tenga receptores específicos a través de los cuales ejerce su acción sobre las células. Sin embargo, existen datos experimentales de que el etanol es capaz de modificar este proceso descrito y que globalmente se conoce como “transducción de señales”. El funcionamiento óptimo de estos mecanismos de transducción de señales se analiza evaluando diferentes parámetros tras la estimulación celular: concentración de segundos mensajeros intracelulares (calcio, inositoltrifosfato, diacilglicerol), producción de proteínas específicas (interleukinas, receptores), expresión de moléculas en la membrana celular (receptores, antígenos de activación) o la proliferación celular (9).

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

En estudios in vitro con linfocitos humanos en situación basal, la exposición aguda o crónica al etanol modifica (incrementa) la movilización de calcio intracelular cuando estas células son re-expuestas al etanol (20). Sin embargo, en los linfocitos humanos que han sido pre-tratados con etanol y posteriormente se estimulan con diversos mitógenos (anti-CD3, anti-CD2, lectinas, interleukinas) se detecta una disminución en la movilización de calcio e inositoltrifosfato intracelular, en la inducción de “early-genes” (c-fos), en la expresión de ciertos antígenos de activación (CD26) y en la proliferación celular respecto a los linfocitos no incubados con etanol (20,24-26). Asimismo, los linfocitos de sangre periférica de alcohólicos crónicos con y sin hepatopatía asociada presentan una movilización de calcio y generación de inositoltrifosfato deficiente (20,27) y una peor respuesta proliferativa (28-30) respecto a controles no bebedores tras estimulación con diversos mitógenos. También se ha observado que la concentración intracelular de AMPc basal y tras estimulación está reducida en un 75% en los linfocitos de alcohólicos crónicos respecto a controles no bebedores (22,23). Además, existen evidencias que el etanol puede modular la función de los factores de transcripción nuclear (9). El factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (FN $\kappa\beta$) regula la expresión de múltiples genes que codifican interleukinas como: factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleukina-10 (IL-10), interleukina-1 β (IL-1 β) e interleukina-6 (IL-6). En situación basal el FN $\kappa\beta$ está en forma inactiva en el citoplasma y se activa por diferentes estímulos extracelulares como virus, lipopolisacárido (LPS), TNF α e IL-1, posteriormente es traslocado al núcleo donde regula la transcripción de diversos genes. Se ha observado que la exposición aguda de células de Kupffer o de monocitos

humanos con alcohol provoca alteraciones en la activación de FN $\kappa\beta$ inducida por LPS y se trasloca al núcleo una subunidad (p50) con efecto preferentemente inhibitorio para la transcripción de genes. Este podría ser el mecanismo responsable de la disminución en la producción de interleukinas proinflamatorias por los monocitos pre-tratados con etanol de forma aguda y posteriormente estimulados con LPS (31,32).

2.1.3 Efectos metabólicos del alcohol y radicales libres.

La vía metabólica principal del etanol es a través de la alcohol deshidrogenasa hepática que cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído. El abuso crónico de etanol induce anomalías metabólicas que pueden afectar la reactividad inmunológica, el crecimiento de las células inmunes y la conversión de ciertos metabolitos en tóxicos (9). Por otro lado, el consumo crónico de etanol induce un incremento de 4 a 10 veces en la actividad del citocromo P450 (2E1), que pertenece al sistema oxidativo microsomal, a resultas de lo cual se genera un exceso de acetaldehído y radicales libres que promueven la peroxidación lipídica. Por último, también es significativa la capacidad del P450 para generar tóxicos a partir de ciertos metabolitos (carcinógenos químicos, vitaminas y fármacos) (33).

El acetaldehído es el metabolito principal que se produce tras la oxidación de etanol, es muy reactivo, y combina fácilmente con proteínas séricas y celulares de animales y humanos que están consumiendo alcohol formando "adducts". Estas moléculas, pueden cambiar la estructura terciaria de las proteínas hasta provocar que la nueva configuración sea reconocida como extraña por el sistema inmunitario (neoantígeno) o bien pueden generar determinantes en las proteínas que contienen acetaldehído que son antigénicos per se. Estas dos posibilidades tienen implicaciones diferentes ya que en el

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

primer caso se genera un anticuerpo contra la proteína modificada mientras que en el segundo el anticuerpo reconoce el epítipo que contiene acetaldehído independientemente de cual sea la proteína transportadora. Se ha demostrado la producción de anticuerpos contra esos "adducts" tras la exposición crónica al etanol y que los "adducts" pueden persistir hasta 30 días después del cese de la ingesta de alcohol. Recientemente, se ha observado que pueden generarse "adducts" de acetaldehído con moléculas no proteicas, "adducts" de proteínas con metabolitos diferentes de acetaldehído y "adducts mixtos" (formados por acetaldehído y malonildialdehído) (9,34). Se ha comprobado que los "adducts mixtos" pueden generar una respuesta inmune de tipo humoral y celular, que al incubarlos con macrófagos peritoneales incrementan la producción de TNF α y aumenta la expresión de moléculas de adhesión en la membrana (LFA-1, MAC-1, ICAM-1). Mientras que en células endoteliales hepáticas incubadas con "adducts mixtos" se observa una hiperexpresión de diversas moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, P-Selectina y PECAM-1) (35,36).

En resumen, la conjugación de acetaldehído con proteínas conduce a la formación de determinantes que actúan como neoantígenos desencadenando la producción de autoanticuerpos contra esos neoantígenos, que, a su vez, pueden estimular a los linfocitos y desencadenar fenómenos de citotoxicidad celular. A nivel clínico, también, pueden ser responsables de los fenómenos de autoinmunidad y de lesión tisular que se detectan en los alcohólicos crónicos. En este sentido se ha referido que estos procesos tendrían un papel relevante en el desarrollo de la trombopenia, anemia hemolítica e incluso hepatopatía que presentan los pacientes alcohólicos crónicos (9,11,35).

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

Los radicales libres de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno) están elevados tras la exposición aguda o crónica in vivo o in vitro al etanol, son producidos, mayoritariamente, por células fagocíticas (células de Kupffer, neutrófilos) y poseen una doble función in vivo: tienen capacidad bactericida y son mediadores de la inflamación. En este último caso, pueden inducir lesión tisular como se ha comprobado en el hígado de animales y seres humanos expuestos al etanol (37). Asimismo, se ha sugerido que el incremento en la producción de TNF α y "macrophage inflammatory protein-2" (MIP2) observado en las ratas alcoholizadas y tratadas con LPS se debería a una activación del NF κ B inducida por los radicales libres de oxígeno (37). Por otro lado, se ha observado que las células fagocíticas pre-incubadas con etanol que posteriormente se exponen a diferentes estimuladores (proteína gp 120 del VIH o LPS) liberan menos radicales libres que las células que no se han pre-incubado con etanol (37,38). Esto implica que, aunque el etanol por sí mismo incrementa la producción de radicales libres, las células fagocíticas así tratadas tienen una capacidad bactericida menor cuando son enfrentadas a bacterias y/o virus (38). En resumen, puede concluirse que el consumo crónico de etanol tiene un doble efecto negativo en lo que respecta a la producción de radicales libres: por un lado, causa una elevación basal de radicales libres capaz de inducir lesión tisular, mientras que por otro, disminuye su producción tras la exposición a virus o bacterias de modo que la capacidad bactericida de las células fagocíticas de los alcohólicos está sensiblemente reducida.

2.2 Factores nutricionales.

El alcoholismo crónico es una de las principales causas de malnutrición en el mundo occidental, el origen de la cual puede ser multifactorial. De hecho, muchos

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

alcohólicos crónicos sustituyen la ingesta proteico-calórica por etanol y, además, el propio alcohol es capaz de producir maldigestión, malabsorción y defectos en el almacenamiento, activación y excreción de vitaminas y minerales (39). El estado nutricional de los alcohólicos depende en gran medida del status social del individuo y la presencia de hepatopatía alcohólica. Así, se ha observado que la prevalencia de malnutrición es más elevada en los pacientes de clase social más baja y afectos de hepatopatía, que puede alcanzar hasta el 30% (39,40). Diversos estudios realizados en nuestro medio han concluido que los alcohólicos sin patología asociada presentan unos parámetros nutricionales similares o incluso más elevados que la población general (39). En un trabajo realizado por nuestro grupo (40) se detectó que un 10% de los pacientes padecían malnutrición calórica, un 6% proteica y únicamente un 2% mixta. Además de malnutrición global, los alcohólicos crónicos pueden padecer carencias de vitaminas u oligoelementos específicos y entre los más frecuentes se encuentran: ácido fólico, piridoxina (B₆), tiamina (B₁), ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantoténico, biotina, vitaminas B₁₂, C, D, A, K, E y como oligoelementos zinc, magnesio y selenio (39). Se calcula que hasta un 75% de los alcohólicos crónicos no ingieren las cantidades recomendadas adecuadas de vitaminas A, C, tiamina, ácido fólico, piridoxina y ácido nicotínico (39,41).

Por otro lado, está documentado que tanto la malnutrición calórica y proteica así como déficits específicos de vitaminas u oligoelementos pueden inducir diversas anomalías en el funcionamiento del sistema inmune, que afecta de manera más notoria a la inmunidad celular y a la no específica, y en menor medida a la inmunidad humoral (42). Habitualmente los defectos inmunitarios suelen ser comunes para las diversas

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

deficiencias, aunque existen algunas peculiaridades según los casos. La existencia de malnutrición calórica o proteica se ha relacionado con disminución de la fagocitosis, de la movilización y quimiotáxis de neutrófilos y de la producción de IL-1 (42). Las diversas carencias vitamínicas más frecuentes en los alcohólicos se han relacionado con diferentes disfunciones del sistema inmunitario de los humanos. Así, se ha detectado disminución en los tests de hipersensibilidad retardada cutánea en relación a déficit de piridoxina, vitamina C y ácido fólico; disminución de la producción de anticuerpos por carencia de piridoxina y vitamina E; anomalías en la fagocitosis, quimiotáxis y mitogénesis de neutrófilos por déficit de vitamina C, E y ácido fólico; disminución de factores del complemento por carencia de vitamina C y alteraciones en la producción de interleukinas por déficit de vitamina E (39,42). Por otro lado, los déficits de oligoelementos más comunes en los alcohólicos que se han relacionado con alteración del sistema inmune son el déficit de zinc, magnesio y selenio que se relacionan con disminución de la mitogénesis, descenso de células NK y de quimiotáxis de neutrófilos (42).

Es lógico suponer pues que la existencia de malnutrición y/o déficits vitamínicos o minerales específicos pueden ser los responsables o co-responsables de las anomalías del sistema inmune detectadas en los alcohólicos crónicos que al actuar sinérgicamente junto al etanol agravan la situación de inmunodeficiencia (8,41). Para eliminar este factor de confusión solo deberían estudiarse pacientes en los que se haya evaluado profusamente su estado nutricional de tal modo que en caso de detectar alguna anomalía en su sistema inmune no pueda ser atribuido a carencias nutricionales sino únicamente al abuso crónico de etanol.

2.3 Factores genéticos.

Como en el resto de alteraciones asociadas al alcoholismo crónico, dado que no todos los alcohólicos crónicos desarrollan anomalías en su sistema inmunitario, se ha sugerido la posible existencia de factores genéticos o ambientales que determinarían una mayor susceptibilidad a padecer estos defectos. A nivel del sistema inmune no se han concretado anomalías genéticas específicas que puedan explicar esta situación. Sin embargo, se ha observado que alguna alteración en los mecanismos de transducción de señales intracelulares (producción de AMP cíclico) en linfocitos de alcohólicos persisten, sin estar expuestos al etanol, incluso después producirse la división de dichas células hasta cinco veces lo que implicaría una cierta susceptibilidad genética en ciertos grupos de alcohólicos para desarrollar este tipo de anomalías (23).

3. EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA INMUNE. EVIDENCIAS EXPERIMENTALES.

El funcionamiento óptimo del sistema inmunitario requiere un grado elevado de interacción y regulación entre los diferentes tipos celulares que lo integran. Es obvio pensar que el efecto deletéreo del alcohol sobre el sistema inmune puede ser debido tanto a una acción directa del alcohol o sus metabolitos sobre las células inmunes como de forma indirecta modificando los mecanismos de interacción intercelular. Ninguno de los dos mecanismos excluye al otro y posiblemente coexisten ambos en la lesión inmunológica asociada al consumo de etanol. A continuación se describen los eslabones de la respuesta inmune sobre los que puede actuar el etanol y las evidencias experimentales en las que se basan estos conocimientos. Los estudios experimentales descritos se basan en la utilización de animales alimentados con etanol de forma crónica

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

(en dosis que representan entre 15-40% de la ingesta calórica diaria) posteriormente se obtienen células inmunes de esos animales y se estudian diferentes parámetros inmunológicos. En otras ocasiones se obtienen las células de animales o de seres humanos y posteriormente se exponen al etanol in vitro de forma aguda o crónica. Por último, también pueden utilizarse células inmunes de alcohólicos crónicos, que por lo tanto han estado expuestas al etanol in vivo, y una vez obtenidas son sometidas a diferentes situaciones y analizada su respuesta..

3.1 Efectos cuantitativos del alcohol sobre las células inmunes.

La administración aguda o crónica de etanol a animales de experimentación produce pérdida de linfocitos del timo, bazo y ganglios. Las células que se pierden incluyen linfocitos B, linfocitos NK y timocitos, y aunque no se conoce el mecanismo íntimo de esta pérdida celular se ha sugerido que la apoptosis inducida/agravada por el etanol juega un papel relevante (9). De hecho se ha demostrado en estudios in vitro que el etanol acelera el proceso de apoptosis en timocitos, y linfocitos B y T del bazo (43,44).

3.2 Efectos cualitativos del alcohol sobre las células inmunes.

3.2.1 Linfocitos T

La exposición aguda o crónica al etanol provoca que las células mononucleares y los linfocitos T tengan una respuesta proliferativa más pobre tras ser estimuladas con agentes no específicos (lectinas) o con el receptor de la célula T (anti-CD3). Esta evidencia se basa en datos obtenidos de linfocitos de animales alimentados con etanol (9), de alcohólicos crónicos con y sin hepatopatía y de controles sanos incubados con etanol (24,29,30,45) . Además, se ha observado que la exposición aguda in vitro al etanol

dificulta la activación de linfocitos T cooperadores (CD4⁺) que se manifiesta por la falta de incremento en la expresión de CD26 (antígeno de activación linfocitaria) (21) y produce una alteración en la secreción de citocinas secretadas por los linfocitos T (9). Por último, también se ha observado una disminución del reclutamiento de linfocitos T en focos de inflamación en ratones alcoholizados (9,21).

3.2.2 Células NK.

Existe una amplia variabilidad de resultados que están muy influenciados por diversos factores como: tipo de experimento realizado, dosis de etanol administrado y si la exposición es aguda o crónica (9). In vitro, se ha observado que la exposición aguda al etanol puede incrementar o disminuir la actividad NK en células humanas según la determinación de la actividad NK sea en el momento de la exposición al etanol o posteriormente (46). En voluntarios sanos a los que se les administró una dosis aguda de etanol no se les detectaron cambios en la actividad NK (46), mientras que la actividad de las células NK obtenidas de alcoholicos crónicos puede ser normal si no existe hepatopatía asociada (47) y tiene tendencia a estar disminuida (47) o claramente suprimida (48) si coexiste hepatopatía enólica. En animales de experimentación la supresión de la actividad NK se ha correlacionado con la susceptibilidad para desarrollar metástasis tumorales (49).

3.2.3 Polimorfonucleares neutrófilos.

Diversos estudios han confirmado que el etanol in vivo e in vitro altera diversas funciones de los polimorfonucleares neutrófilos como la migración, quimiotaxis y adherencia tanto en animales alcoholizados como en humanos (5,8,10,50). Asimismo se ha observado que los neutrófilos de ratas alimentadas con etanol tienen una capacidad

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

bactericida disminuida frente a las bacterias causantes de neumonía como *Streptococcus pneumoniae*, aunque puede ser normal frente a otras bacterias (50). Por otro lado, se ha detectado que en ratas alcoholizadas se incrementa la expresión de CD18 (β_2 integrina) en los polimorfonucleares neutrófilos de sangre periférica y aumenta la liberación de sustancias quimiotácticas para los neutrófilos por las células de Kupffer del hígado, hecho que facilitaría la infiltración del tejido hepático por estas células en la hepatitis alcohólica aguda (9,51). En resumen, los datos que se disponen sugieren que el etanol deteriora la capacidad bactericida de los neutrófilos mientras que induce cambios que facilitan la aparición de infiltrados inflamatorios en el hígado lo que puede contribuir a desarrollar una hepatopatía alcohólica.

3.2.4 Monocitos/Macrófagos.

Muchas de las anomalías inmunitarias detectadas en los alcohólicos están relacionadas a alteraciones en la función de los monocitos aunque se ha referido que no todos los monocitos/macrófagos de todas las localizaciones anatómicas responden de igual manera al efecto del etanol. El monocito tiene un importante papel en la respuesta inmune específica como célula presentadora de antígenos y como productora de interleukinas inmunoreguladoras (IL-10, IL-12) y también durante la inflamación produciendo citokinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α) (52). Experimentalmente, se ha demostrado que la exposición aguda *in vitro* al etanol (a una concentración entre 50-150 mM) de monocitos humanos estimulados induce cambios en la producción de TNF α , tumor growth factor β (TGF β), interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interleukina-12 (IL-12) e interleukina-1 β (IL-1 β) y disminución en la capacidad de

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

presentar antígenos a los linfocitos T (8,9,52,53). También se han referido disminución de la capacidad bactericida de las células de Kupffer de ratas alcoholizadas (8) mientras que los macrófagos alveolares de alcohólicos tienen reducida su capacidad para producir interleukinas proinflamatorias, superóxido y deteriorada su función bactericida (8,9). Estos hallazgos sugieren que el etanol tiene un efecto predominante depresor de las funciones del monocito y ello puede contribuir a que los alcohólicos crónicos tengan una respuesta más deficiente frente a las agresiones por bacterias y virus (8,9), y de este modo ser más susceptibles a ciertas infecciones (neumonía) (9).

3.3 Efecto del alcohol sobre la migración de células inmunes y en la expresión de moléculas de adhesión.

Desde hace años se sabe que la exposición aguda al etanol disminuye la migración de polimorfonucleares neutrófilos a focos de inflamación tanto en animales como en humanos, similares observaciones se han referido en los linfocitos T de animales alcoholizados (9). Estas evidencias, junto al hecho de que las moléculas de adhesión (MA) que se expresan en la membrana de los leucocitos y en el endotelio son fundamentales en los procesos de trans migración de las células inmunes a través de la pared vascular hacia los focos inflamatorios, ha realzado el interés del estudio de estas moléculas en situaciones de exposición al etanol (9). Se han referido descensos en la expresión de dichas MA en casos de exposición aguda al etanol, mientras que la exposición crónica se ha asociado preferentemente a incrementos en la expresión de MA (9,51,54). El incremento en la expresión de MA se ha relacionado con el infiltrado inflamatorio que se detecta en el hígado de la hepatopatía alcohólica. Se observa, pues, que el efecto que el etanol puede ejercer sobre la expresión de MA puede ser diferente

según la exposición sea aguda o crónica y que la hiperexpresión de MA tras la exposición crónica podría responder a un estado de adaptación de la membrana al efecto inhibitorio del etanol (9). Sin embargo, es difícil extraer conclusiones sobre la función de las MA en el alcoholismo crónico basándonos en hallazgos de estudios fenotípicos. Aunque los estudios funcionales son escasos algún estudio ha demostrado que la exposición aguda al etanol disminuye la adhesión de linfocitos T CD4⁺ humanos vía CD18 (β_2 integrina) a astrocitos en forma dosis dependiente (21).

3.4 Efecto del alcohol en la regulación del sistema inmune.

3.4.1 Efecto del alcohol en las interacciones entre linfocitos y monocitos .

En circunstancias normales los monocitos presentan el antígeno a la célula T que generará una respuesta inmunitaria a través de los linfocitos B (producción de anticuerpos) o de los propios linfocitos T (inmunidad celular retardada). Se ha demostrado que la incubación de monocitos humanos con etanol disminuye la capacidad de éstos para presentar antígenos a los linfocitos T. Se considera que este efecto sería indirecto a través de la capacidad del etanol para reducir la producción de IL-1 β e incrementar la de TGF- β (9,52,55). Estudios realizados con monocitos de ratas alcoholizadas han confirmado una reducción en la capacidad para presentar antígenos y que la inmunidad celular retardada está disminuida únicamente si la exposición al etanol es previa a la presentación de antígenos. Con estos datos, parece lógico que la reducción de la inmunidad celular retardada detectada en alcohólicos crónicos se debe a una alteración en los primeros estadios de la presentación de antígenos bien, por un cambio funcional de los monocitos o bien debido a alteración en la interacción linfocito/monocito (9).

3.4.2 Efecto del alcohol sobre la respuesta inmune TH1/TH2.

Recientemente, se han diferenciado las células T cooperadoras (CD4⁺) en TH1 y TH2 definidas tanto por el perfil de citocinas secretado como por la respuesta inmune que generan que son mutuamente excluyentes. En procesos de inmunidad celular actúan las células TH1 y en las de inmunidad humoral las TH2. En las respuestas TH1 participan sobretodo las citocinas IL-12 e IFN γ , mientras que en la TH2 lo hacen IL-10, IL-4 e IL-5 (9,56,57). Las células presentadoras de antígenos son fundamentales para desarrollar un patrón TH1 o TH2 porque las características de los antígenos reconocidos por ellas determinarán el tipo de respuesta que debe generarse. Existe la evidencia de que si el balance de respuesta TH1/TH2 se desvía excesivamente en una dirección, se puede desarrollar una enfermedad inmunológica. De este modo, la autoinmunidad se asocia a exceso de respuesta TH1, mientras que la inmunodeficiencia y alergias a TH2 (9). Las anomalías inmunológicas detectadas en los alcohólicos crónicos (hipergammaglobulinemia + inmunodeficiencia) se considera que podría ser resultado de un exceso de respuesta TH2. Existen estudios in vitro con monocitos humanos y de rata y células esplénicas de ratón que demuestran que la exposición aguda al etanol induce una respuesta de tipo TH2 al observarse incremento en la producción de IL-4 e IL-10, junto a una disminución de las citocinas TH1 (IL-12, IFN γ) (53,56,57). Se ha considerado que la depleción de glutatión intracelular podría ser el mecanismo a través del cual el etanol indujera una respuesta de tipo TH2. Sin embargo, no existen hasta el momento estudios que confirmen esta alteración del balance TH1/TH2 en alcohólicos crónicos (9).

3.4.3. Interacciones del alcohol y citokinas.

Las citokinas son polipéptidos reguladores secretados, bajo estímulos apropiados, por una amplia variedad de células (linfocitos, macrófagos, células endoteliales y otras) que se producen durante una respuesta inmune o inflamatoria y que afectan a las células vecinas activándolas o inhibiéndolas (8,58). Existen evidencias que el etanol puede alterar la producción y secreción de citokinas y, de esta manera, modular la respuesta inmune (8). Alguno de los resultados obtenidos son contradictorios porque el efecto del alcohol sobre la producción y secreción de citokinas puede diferir según el tipo de célula utilizada, la exposición aguda o crónica al etanol y la coexistencia o no de hepatopatía alcohólica (9).

Experimentalmente se ha comprobado que en ratas (alcohólicas o no) estimuladas con LPS y posteriormente expuestas de forma aguda al etanol disminuye la secreción de TNF α respecto a las que no han sido expuestas al etanol (59). También se ha observado que la producción de MIP2 (54) y de IL-8 (51) por células de Kupffer obtenidas de ratas alimentadas con etanol está incrementada respecto a los controles. En humanos, se disponen de estudios realizados con monocitos estimulados con LPS y posteriormente expuestos de forma aguda al etanol y detectan una disminución en la producción de TNF α , IL-1 β e IL-12 e incremento de IL-10, y TGF- β (9). Otros autores no detectaron diferencias en la producción de IL-6 e IL-8 por células mononucleares de sangre periférica de controles y alcohólicos no hepatópatas expuestos de forma aguda al etanol *in vitro* (60). La alteración en el balance de determinadas citokinas inducido por el etanol apoyaría la hipótesis de que el alcoholismo crónico distorsiona el balance TH1/TH2 en favor de esta última (9).

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

También se ha estudiado el papel que juegan las citocinas en la hepatopatía alcohólica, en este contexto han sido las interleukinas proinflamatorias las que más y mejor se han estudiado (61). Se ha observado que los monocitos de sangre periférica o las células de Kupffer de pacientes con hepatopatía alcohólica tienen incrementada la producción de IL-1, TNF α , IL-6 e IL-8 (61) mientras que está disminuida la de IL-10 (9) y que estas células liberan más TNF α cuando son estimuladas con LPS. Es conocido, asimismo, que el TNF α es un inductor de apoptosis y que la IL-10 ejerce un efecto protector frente al TNF α . Estos datos en su conjunto podría explicar porque los pacientes que padecen un episodio de hepatitis alcohólica aguda y tienen niveles más elevados de TNF α tienen mayor lisis celular y peor pronóstico (9). Por último, también se ha detectado una disminución de la producción de IFN γ e incremento de IL-6 por linfocitos estimulados de alcohólicos hepatópatas (9,62). Como ya se ha comentado, los monocitos/macrófagos de diferentes lugares anatómicos responden de diferente manera a la exposición al etanol y esto provoca que la producción de interleukinas sea diferente según sea el tejido que estemos analizando. Así, se ha referido que la producción de interleukinas proinflamatorias por macrófagos alveolares estimulados con LPS está reducido en alcohólicos y en animales alimentados con etanol y que además la expresión del receptor de alta afinidad para TNF α en macrófagos alveolares disminuye tras exposición crónica al etanol. Estos hallazgos aportarían luz sobre uno de los posibles mecanismos que explicarían la mayor susceptibilidad a desarrollar una neumonía entre los alcohólicos (59).

No es bien conocido a través de que mecanismo el alcohol podría alterar la producción

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

de interleukinas, sin embargo, existen evidencias experimentales que sugieren que esta disregulación en la producción de citokinas podría estar mediada a través del efecto del etanol sobre algunos factores de transcripción nuclear (FN $\kappa\beta$) que controlan la expresión de múltiples genes que codifican interleukinas (9,31,32).

4. ESTADO DEL SISTEMA INMUNE EN ENFERMEDADES CON ELEVADA PREVALENCIA EN ALCOHÓLICOS CRÓNICOS.

4.1 Enfermedades asociadas a déficit inmune.

4.1.1. Neumonía.

En base a estudios epidemiológicos y clínicos, desde hace tiempo se sabe que el alcoholismo crónico es un factor de riesgo para el desarrollo de neumonía adquirida en la comunidad (5,7). Además, los alcohólicos con neumonía sufren una mayor incidencia de complicaciones como abscesificación, empiema y afección extrapulmonar que la población no bebedora (7,50). El germen más frecuente es el *Streptococcus pneumoniae* al igual que en la población no alcohólica. Entre las alteraciones del sistema inmunitario que pueden contribuir a esta mayor susceptibilidad en los pacientes alcohólicos se han descrito: menor capacidad bactericida del suero, deficiente quimiotáxis, adherencia y migración de polimorfonucleares neutrófilos, reducida capacidad para procesar y atrapar antígenos de los macrófagos alveolares y anomalías en la distribución de subclases de Ig G a nivel broncoalveolar y de la función ciliar (5,63). Asimismo en estudios experimentales se ha observado que la neumonía causada por *K. pneumoniae* o *S. pneumoniae* tiene una mayor mortalidad en los ratones prealimentados etanol que en los controles (9) y que existe un déficit en la capacidad bactericida de los neutrófilos de rata alimentadas con etanol frente a diversos tipos de *S. pneumoniae* (50). El conjunto de

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

datos experimentales, clínicos y epidemiológicos apoyan que el abuso crónico de alcohol es un factor de riesgo para el desarrollo de neumonía adquirida en la comunidad y que esta mayor susceptibilidad se basa en diferentes efectos deletéreos del etanol sobre el sistema inmune de los alcohólicos.

4.1.2 Tuberculosis .

La literatura médica está llena de publicaciones que muestran una asociación entre el alcoholismo crónico y la tuberculosis. Un problema fundamental para profundizar en el conocimiento de esta asociación es poder distinguir entre el papel desempeñado por etanol per se y el de otras secuelas frecuentes en el alcoholismo crónico como desnutrición, hepatopatía, tabaquismo, hábitos higiénicos y estilo de vida que también tienen un papel en el desarrollo de la tuberculosis. Diversos estudios clínicos muestran una mayor incidencia de tuberculosis, de hallazgos radiológicos sugestivos de tuberculosis y de prueba de la tuberculina positiva entre la población alcohólica que entre la abstinencia. Por otro lado, entre los pacientes diagnosticados de tuberculosis pulmonar en una unidad de urgencias la prevalencia de alcoholismo es muy superior (69%) que entre el resto de pacientes atendidos (18%) (59). Los estudios in vitro realizados hasta el momento sustentan la idea que el alcohol afecta varias funciones de los monocitos que incluyen la habilidad para controlar el crecimiento bacteriano intracelular y la presentación de antígenos a las células T (55) además de alterar la formación de granulomas y de disminuir la capacidad bactericida de los macrófagos (55,59), lo que facilita la diseminación de mycobacterias. Recientemente, el descubrimiento de la importante función del TNF α en la respuesta inmune normal frente a numerosas infecciones y el hecho de que el etanol puede alterar su producción

y la expresión de su receptor en la membrana de los macrófagos alveolares han puesto de relieve la posible disfunción de TNF α como uno de los mecanismos implicados en la mayor susceptibilidad de los alcohólicos crónicos a padecer una tuberculosis pulmonar (9,59)

4.1.3. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Hasta el momento el efecto del abuso crónico de etanol sobre la infección por el VIH no está claramente determinada. Los resultados de diversos estudios epidemiológicos y de laboratorio han sido contradictorios. Por un lado se ha referido que la prevalencia de abuso de alcohol es más elevada (41%) entre pacientes infectados por el VIH que en la población general (64), pero en contraposición no hay estudios epidemiológicos que demuestren diferencias en la tasa de progresión a SIDA según el grado de consumo de etanol. Paralelamente, los estudios de laboratorio también han obtenido resultados contradictorios. Se ha descrito que el etanol disminuye *in vitro* la actividad NK y la capacidad proliferativa de los linfocitos de pacientes infectados por el VIH (64) en respuesta a la proteína env-gag del VIH y que la proliferación del VIH en células mononucleares incubadas con etanol está incrementada según unos autores e inmodificada según otros (9,64). Estudios clínicos han detectado un incremento de la subpoblación CD4⁺ en pacientes alcohólicos con SIDA que abandonan la bebida (64) mientras que otro trabajo en pacientes drogadictos seropositivos seguidos durante 5 años ha observado que las anomalías en las subpoblaciones de linfocitos T eran más acusadas en los que consumían dosis elevadas de etanol que en los abstemios (9). En resumen, ninguno de los estudios detecta ni a nivel experimental ni clínico que el alcohol mejore los parámetros analizados en los pacientes infectados por el VIH, pero

tampoco se han obtenido evidencias irrefutables de que el alcoholismo crónico empeore el pronóstico de los pacientes infectados por el VIH.

4.1.4. Infección por el virus de la Hepatitis C.

Estudios poblacionales han sugerido que existe una incidencia incrementada del 10% para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) entre los alcohólicos comparados con personas no bebedoras una vez excluidos otros factores de riesgo. El aparente incremento en la incidencia de infección por VHC en los alcohólicos ha llevado a especular que los alcohólicos que desarrollan cirrosis serían únicamente aquellos que están infectados por el VHC y quizás que el alcoholismo de alguna manera podría predisponer a la infección por VHC aunque no existen evidencias experimentales de esta hipótesis (9).

4.1.5. Cáncer.

En base a estudios de casos y controles y epidemiológicos, el abuso crónico de alcohol ha sido reconocido durante largo tiempo como un factor de riesgo mayor para el desarrollo de cáncer, aunque, las evidencias experimentales son escasas (6,65,66). La asociación entre elevado consumo de etanol y cáncer parece especialmente fuerte cuando se consideran las neoplasias del tracto superior digestivo y respiratorio aunque también se ha referido relación con neoplasias de páncreas, estómago y mama (65,66). El etanol no es carcinógeno per se y por lo tanto habría que buscar otros efectos para explicar la relación entre el alcoholismo crónico y cáncer. Se sabe que el etanol puede actuar como co-carcinógeno al activar las enzimas microsomales y así incrementar la concentración de carcinógenos como las nitrosaminas. Por otro lado, tanto el etanol como acetaldehído inhiben la acción de una enzima reparadora de DNA (metilguanina

DNA metiltransferasa) lo cual facilitaría la persistencia de mutaciones con su posible papel oncogénico. Por último, el etanol puede actuar como promotor de la carcinogénesis al dañar las células epiteliales e incrementar la proliferación celular (65). Asimismo, el efecto inmunosupresor del abuso crónico de alcohol también podría favorecer la progresión del cáncer aunque existen escasos estudios experimentales que lo demuestren. De forma no experimental se ha atribuido esta asociación a una alteración en la producción de citokinas, disminución de la actividad NK, depleción de linfocitos esplénicos, alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias y otras alteraciones de la inmunidad celular (6,8). Recientemente, un estudio experimental en ratas ha demostrado que la intoxicación etílica aguda induce una marcada reducción de la actividad NK in vivo y un incremento notorio en el número de metástasis tumorales (49).

4.2. Enfermedades con componente autoinmune.

4.2.1. Hepatitis alcohólica aguda y Cirrosis hepática alcohólica (HAA y CHA).

La hipótesis de que la hepatopatía alcohólica está mediada por mecanismos inmunológicos se basa en datos clínicos, histológicos e inmunológicos. Es conocido que pacientes con HAA pueden continuar empeorando su función hepática incluso semanas después de abandonar el alcohol lo que sugiere que en esa fase el daño hepático no está relacionado con la presencia directa de alcohol. Además, los pacientes que se recuperan tras un primer episodio de HAA y vuelven a beber sufren nuevos episodios de HAA de mayor gravedad que el inicial, aunque el consumo de etanol sea menor, sugiriendo la existencia de un proceso autoinmune contra algún componente

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

del tejido hepático del paciente que se intensifica al consumir de nuevo alcohol (9).

En el tejido hepático de pacientes con HAA se observa un infiltrado inflamatorio en el que predominan polimorfonucleares neutrófilos mientras que en la CHA predominan células mononucleares. Se ha sugerido que estas células pueden participar en la aparición y desarrollo de la lesión hepática a través de diferentes mecanismos (9,12). Dada la existencia de estos infiltrados en la hepatopatía alcohólica, se ha sugerido que determinadas moléculas de adhesión (MA) y factores quimiotácticos (51,54) podrían jugar un papel determinante en su aparición (12). En este sentido, se ha demostrado en animales de experimentación alimentados con etanol que las células de Kupffer secretan una mayor cantidad de factores quimiotácticos para neutrófilos que los controles que no han recibido etanol. Además, tanto los hepatocitos como los neutrófilos de los animales alcoholizados presentan una hiperexpresión de ICAM-1 y de su contrarreceptor CD18 (51,54). En sujetos con HAA y CHA también se ha observado un incremento en los niveles séricos circulantes y en la expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio vascular hepático. Así, los pacientes con HAA presentan una mayor expresión tisular y mayores niveles séricos de E-selectina e ICAM-1 que los controles, mientras que los pacientes con CHA presentan niveles séricos y expresión tisular elevada de ICAM-1 y VCAM-1 (12-14). El predominio de un tipo u otro de MA expresada en el endotelio vascular hepático, regulado a su vez por las citocinas del microentorno, condicionaría el tipo de infiltrado inflamatorio detectado en el hígado (12-14). Paralelamente a cambios en la expresión de MA también se ha detectado incremento de interleukinas proinflamatorias (IL-1, TNF α , IL-6, IL-8) en suero de pacientes con hepatopatía alcohólica (especialmente HAA) (67,68), y alguno de éstos se

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

han relacionado con el grado de lesión hepática y con el pronóstico de los pacientes (8,9). En resumen, existen numerosos datos que sugieren que el alcohol o sus metabolitos son capaces de alterar los mecanismos de inmunoregulación independiente, de la existencia de lesión hepática, y además mediante la formación de “adducts” con estructuras de la membrana de los hepatocitos pueden crearse neoantígenos que serían los responsables de la generación de una respuesta inmune humoral (autoanticuerpos) y celular (linfocitos citotóxicos) contra el hígado. Asimismo, la Ig A que está elevada en alcohólicos crónicos, se deposita en la membrana de los hepatocitos e induce producción de TNF α que a su vez estimula a las células de Ito y la fibrogénesis. Por último existe una liberación notable de citokinas (IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β) por todas las células implicadas (células mononucleares, fibroblastos, células de Kupffer) en este proceso que afectan a los hepatocitos y células de Ito que puede conducir a una proliferación celular descontrolada y fibrogénesis (11).

4.2.2. Otras enfermedades autoinmunes en alcohólicos.

En los alcohólicos crónicos también se han observado otros procesos de probable origen autoinmune. Es conocido que la inmunoglobulina A (Ig A) se deposita en piel, hígado y riñón de muchos alcohólicos con hepatopatía (11). Asimismo la nefropatía Ig A caracterizada por depósitos de esta inmunoglobulina en el glomérulo tiene una mayor incidencia en determinados grupos étnicos de alcohólicos (9). Ya se ha comentado que el abuso crónico de alcohol se relaciona con la formación de “adducts” de acetaldehído u otros metabolitos del alcohol con proteínas séricas o celulares que tienen capacidad para generar una respuesta de autoanticuerpos o citotóxica. Por lo tanto la presencia de autoanticuerpos frente un amplio grupo de tejidos o moléculas en alcohólicos crónicos

que incluyen, linfocitos, cerebro, DNA, lipoproteínas, proteínas hepáticas y otros sugiere la posibilidad adicional de otras enfermedades de estirpe inmunológica en alcohólicos crónicos (9,11).

5. ANOMALÍAS DEL SISTEMA INMUNE OBSERVADAS EN ALCOHÓLICOS CRÓNICOS.

El principal sesgo de estos trabajos es que bajo el concepto “alcohólicos crónicos” se incluyen diferentes tipos de pacientes, es decir, con o sin hepatopatía, bien o mal nutridos y alcohólicos activos o pacientes con diferentes periodos de abstinencia enólica. Incluso en algunos de los trabajos publicados no se evalúan estos factores coadyuvantes. Todo ello hace que los diferentes grupos de pacientes estudiados sean muy heterogéneos y se obtengan resultados en ocasiones contradictorios.

5.1. Elevación de inmunoglobulinas en suero.

Los alcohólicos crónicos tienen niveles más elevados de inmunoglobulinas en suero a expensas de las tres clases principales de inmunoglobulinas (A, G y M) respecto a la población abstemia. En general los niveles son más elevados cuanto mayor es el consumo de etanol (69) y si coexiste hepatopatía alcohólica (70) aunque hay autores que refieren que la inmunoglobulina A se eleva en alcohólicos con y sin hepatopatía, mientras que la Ig G sólo se incrementa en aquéllos en los que coexiste hepatopatía, y la Ig M cuando existe hepatopatía descompensada (70). A pesar de la hipergammaglobulinemia, los alcohólicos son individuos inmunodeficientes con un mayor riesgo para padecer infecciones y en los que existe una incidencia incrementada de fenómenos autoinmunes (9). Paradójicamente, aunque existe un exceso de producción de anticuerpos en los alcohólicos crónicos, éstos suelen tener discretamente

disminuidos los linfocitos B. In vitro, en situación basal se ha referido una mayor síntesis de inmunoglobulinas por linfocitos de alcohólicos que de controles, sin embargo cuando los linfocitos son estimulados con ciertos mitógenos la producción de inmunoglobulinas es menor en los linfocitos de los alcohólicos (70,71). De este modo, parece que la existencia de hipergammaglobulinemia e inmunodeficiencia detectada en los alcohólicos es debida más a cambios en la regulación de los linfocitos B que a cambios cuantitativos en éstos. No obstante, recientemente se han detectado alteraciones de diversas subpoblaciones de linfocitos B en concreto pérdida de las células $CD19^+CD5^-CD45RA^{hi}$ y persistencia de las $CD19^+CD5^-CD45RA^{lo}$ que se han relacionado con la mala respuesta a antígenos externos y con la formación de autoanticuerpos respectivamente (70), por lo que habría que considerar que los alcohólicos crónicos presentan una alteración cuantitativa y cualitativa de los linfocitos B.

5.2. Inmunidad celular.

En estudios in vitro se ha detectado una respuesta proliferativa menor de los linfocitos o células mononucleares de alcohólicos cuando son expuestos a estímulos inespecíficos (fitohemaglutinina, concanavalina A, ésteres de forbol) y también tras la exposición a estímulos más fisiológicos como el receptor de la célula T (anti-CD3). En general, los alcohólicos crónicos presentan una respuesta más pobre que los controles aunque en algunos estudios sólo se ha observado este descenso en alcohólicos hepatópatas (29,45) y en otros en pacientes sin hepatopatía (30). También se ha referido una disminución de la capacidad bactericida de los macrófagos en los alcohólicos crónicos (8,9) mientras que la funcionalidad de las células NK puede estar disminuida,

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

incrementada o incluso inalterada (8,47,48,72). A nivel clínico, los cambios observados hacen referencia a una reducción en los tests de hipersensibilidad cutánea retardada (tuberculina, cándidas) en los alcohólicos respecto a los abstemios, hecho que parece, estar más relacionado con el consumo de etanol que con la existencia de hepatopatía subyacente (9).

5.3. Alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias y activación persistente.

En algunos estudios no se han observado diferencias en los linfocitos T ($CD2^+/CD3^+$) entre alcohólicos con (29,45,72) y sin hepatopatía (45,69), respecto a controles no bebedores, mientras que en otros se ha detectado un incremento significativo en los alcohólicos no hepatópatas respecto a controles abstemios (71,73). Los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) parecen estar inalterados en unos casos (29,69,72,73) mientras que en otros autores se ha observado un incremento significativo en alcohólicos con hepatopatía (45). Respecto a los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) se han detectado invariados en pacientes con (29) y sin hepatopatía (69,72,73), mientras que otros autores los encuentran disminuidos en pacientes con hepatopatía alcohólica (45). La relación $CD4/CD8$ tiene tendencia a estar incrementada sin alcanzar la significación estadística. Recientemente, se han detectado cambios en la expresión de CD45RA, L-selectin y CD11b en los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Se ha sugerido que estos cambios implican una pérdida de las funciones reguladoras de estas células y un incremento de su función citotóxica (74).

En ningún estudio se ha detectado una disminución de linfocitos B en pacientes alcohólicos sin hepatopatía (69-73) pero sí cuando se asocia hepatopatía (70). En uno de los trabajos se hallan cifras menores de linfocitos B en pacientes con mayor

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

consumo de etanol, pero las diferencias no alcanzan la significación estadística (69). Más recientemente se ha referido que algunas subpoblaciones de linfocitos B son diferentes en los alcohólicos respecto a los controles y esto podría explicar la deficiente respuesta de los linfocitos B de aquéllos a los antígenos externos y la facilidad para producir autoanticuerpos (70). Analizados conjuntamente, los cambios detectados en los linfocitos T y B de pacientes alcohólicos sugieren que existen alteraciones en las interacciones entre ambos tipos de células que pueden ser responsables de la inapropiada producción de inmunoglobulinas y otros defectos de la regulación inmune en los alcohólicos (9).

Se ha referido que los linfocitos NK pueden estar normales (72), disminuidos (47,71,73) o incluso aumentados (48) en los alcohólicos respecto a los controles, probablemente, estos resultados tan dispares se deben a diferencias metodológicas. Algunos autores han comprobado que estas diferencias se corrigen tras un periodo breve de abstinencia (73), mientras que otros no (48).

Por último, se ha detectado un incremento en la expresión de antígenos de activación en la membrana de linfocitos de sangre periférica de alcohólicos crónicos (8,29,72,73). En concreto, se ha observado incremento en la expresión de CD25 (receptor de interleukina-2), CD71 (receptor de transferrina) y HLA en pacientes con cirrosis alcohólica (29) y de CD25 y HLA DR en pacientes sin hepatopatía (72,73). Estos cambios se relacionan con un estado de activación de la célula T y puede ser debido a un efecto del alcohol o sus metabolitos sobre las propias células inmunes (11,75) o como respuesta a la estimulación antigénica repetida (11). No se conoce el significado de esta activación persistente aunque se ha postulado que podría explicar la

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

expansión clonal de linfocitos T citotóxicos (8). Esta situación de activación persistente puede durar incluso semanas después de abandonar el consumo de etanol (9).

5.4. Otras anomalías del sistema inmune detectadas en alcohólicos crónicos.

Algunos autores han estudiado la expresión de algunas MA en linfocitos de sangre periférica de alcohólicos no hepatópatas (71) y se han observado diferentes anomalías en la expresión de algunas MA como L-selectin y CD11b que afectan sobretodo a la población CD8⁺ (células citotóxicas), lo que puede implicar una pérdida de la capacidad reguladora y un incremento del potencial citotóxico en alcohólicos (71,74). Por otro lado, se ha referido una disminución de la expresión de CD31 (PECAM-1) en células CD4⁺ en alcohólicos no hepatópatas, lo cual puede ocasionar un reducción en la recirculación linfocitaria necesaria para mantener la competencia inmunológica normal (71). Por último, en los alcohólicos sin hepatopatía alcohólica se ha detectado un incremento significativo de endotoxina circulante, probablemente relacionado con la disminución en la capacidad de aclaramiento de las células de Kupffer (8), y una tendencia a tener una mayor concentración de TNF α , mientras que tanto IL-1 α como IL-6 no cambian (68). Ello sugiere que los alcohólicos con hepatopatía presentan cambios en el perfil de citokinas, pero que como también existen en alcohólicos sin lesión hepática relevante, estos cambios se han relacionado con el propio consumo de etanol. Por todo ello, algunos autores han señalado que estas alteraciones de las citokinas pueden jugar un papel fundamental en la iniciación y continuación de la hepatopatía alcohólica (11,68).

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

Para el estudio, se han seleccionado pruebas inmunológicas que valoren tanto a las células inmunes como a las células endoteliales, ambas básicas en el desarrollo de la respuesta inmunitaria normal. Por todo ello, se han evaluado las subpoblaciones linfocitarias mayores en sangre periférica, la expresión de antígenos de activación linfocitaria y de moléculas de adhesión en linfocitos totales y en diferentes subpoblaciones linfocitarias. Asimismo, se ha determinado la concentración sérica de moléculas de adhesión endoteliales para poder conocer el estado basal del endotelio en los alcohólicos crónicos. Si realmente el abuso del alcohol ejerce algún efecto sobre el sistema inmune deberían hallarse diferencias respecto al grupo control de individuos no bebedores. En ese caso, podrá evaluarse si existe una relación dosis-dependiente entre los parámetros inmunológicos y el consumo crónico de alcohol, como sucede en otras enfermedades asociadas al alcoholismo crónico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

1. Investigar si los pacientes alcohólicos bien nutridos y sin hepatopatía asociada (hepatitis alcohólica aguda y/o cirrosis) presentan alteraciones en su sistema inmune comparados con un grupo control de sujetos sanos no bebedores.
2. En el caso de detectarse diferencias en los diversos parámetros inmunológicos estudiados en el grupo de alcohólicos respecto a los controles determinar si existe alguna relación entre la dosis consumida de alcohol actual y/o acumulada y dichas anomalías.

2.2 Objetivos particulares

1. Determinar si existen diferencias en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias mayores de sangre periférica en alcohólicos crónicos bien nutridos sin hepatopatía asociada respecto a controles sanos no bebedores.
2. Determinar si el porcentaje de linfocitos de sangre periférica que mantienen un estado de activación basal es diferente en alcohólicos crónicos bien nutridos y sin hepatopatía asociada respecto a controles sanos no bebedores.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

3. Determinar si existen diferencias en la expresión de moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de β_1 integrinas, de β_2 integrinas y de la superfamilia de inmunoglobulinas en la membrana de células mononucleares y en diversas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica en alcohólicos crónicos bien nutridos y sin hepatopatía asociada respecto a controles sanos no bebedores.

4. Determinar si el abuso crónico de alcohol modifica la concentración sérica de moléculas de adhesión que participan en fenómenos de interacción leucocito-endotelio e interleucocitarias: E-selectina, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) y Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

III TRABAJOS

TRABAJO 1: LINFOCITOS ACTIVADOS (CÉLULAS CD25⁺ CD69⁺) Y DESCENSO DE LA SUBPOBLACIÓN CD19⁺ EN ALCOHÓLICOS CRÓNICOS BIEN NUTRIDOS SIN PATOLOGÍA ASOCIADA AL ALCOHOLISMO CRÓNICO.

Activated lymphocytes (CD25⁺ CD69⁺ cells) and decreased CD19⁺ cells in well nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases.

E. Sacanella, R. Estruch, A. Gayà, J. Fernández-Solá, E. Antúnez, A. Urbano-Márquez.

Alcohol Clin Exp Res 22:897-901, 1998.

Activated Lymphocytes (CD25⁺ CD69⁺ Cells) and Decreased CD19⁺ Cells in Well-Nourished Chronic Alcoholics without Ethanol-Related Diseases

E. Sacanella, R. Estruch, A. Gayà, J. Fernández-Solà, E. Antúnez, and A. Urbano-Márquez

To assess lymphocyte subsets and expression of activation antigens in peripheral blood lymphocytes (PBLs) in chronic alcoholism, a cross-sectional study with 30 well-nourished chronic alcoholics and 30 controls was performed. Studies included detailed clinical and laboratory evaluation, nutritional status assessment, and determination of lymphocyte subpopulations, as well as activation antigens. A significant decrease of B cells (CD19⁺) was observed in chronic alcoholics, compared with controls ($p < 0.001$). A significant increase of PBLs expressing CD69 and CD25 ($p < 0.01$, both) in chronic alcoholics was also detected, whereas CD71 expression was unaffected. In addition, T lymphocytes expressing HLA-DR were significantly higher in chronic alcoholics than controls ($p < 0.05$). The serum level of soluble interleukin-2 receptor was also significantly higher in the alcoholic group, compared with controls ($p = 0.04$). Moreover, the estimated total lifetime dose of ethanol consumed correlated positively with the percentage of PBLs expressing CD25 ($r = 0.48$; $p = 0.01$) and negatively with PBLs expressing CD71 ($r = -0.39$; $p = 0.04$). By contrast, the changes were not related to age, nutritional status, or the presence of other ethanol-related diseases. In conclusion, chronic alcoholics present a significant decrease of B cells and an "incomplete activation state" of PBLs that depends on the dose of ethanol consumed.

Key Words: Lymphocyte Subsets, Chronic Alcoholism, CD19⁺ Cells, CD25⁺ Cells, Activation Antigens.

THE ASSOCIATION between chronic alcoholism and the development of infectious or neoplastic diseases is a controversial issue only supported by clinical and epidemiological studies.¹⁻⁴ Some authors have thought that this association may be due to a toxic effect of ethanol on the immune system.^{2,5} However, other factors that could influence the development of infectious and neoplastic diseases (such as smoking habit, liver disease, or malnutrition) are frequently linked with chronic alcoholism.⁶ Therefore, the effect of ethanol in humoral and cellular immunity has been investigated in recent years to know whether chronic ethanol consumption may cause, by itself, immunological alterations.

Lymphocyte proliferation,⁷⁻⁹ immunoglobulin production,¹⁰ cytokine synthesis in vivo and in vitro,¹¹⁻¹⁵ lympho-

cyte subsets,^{7,8,10,16-20} and expression of activation antigens^{7,16,17} in peripheral blood lymphocytes (PBLs) have been studied in chronic alcoholics. However, the results obtained are contradictory, probably due to the heterogeneous sample of alcoholic population studied. In fact, some studies do not rule out alcoholic liver disease (ALD) or malnutrition, whereas other studies have included alcoholic patients with variable periods of ethanol abstinence. Thus, the exact role of chronic alcohol consumption in the development of immunological alterations remains uncertain, as does their relationship to factors such as nutritional status, the amount of ethanol consumed, and liver disease.

To know the effect of chronic ethanol intake in lymphocyte subsets and in the expression of activation antigens in PBLs, a study of a homogeneous population of asymptomatic patients with chronic alcoholism was undertaken. We report that well-nourished alcoholic patients present a decrease in the CD19⁺ subset (B lymphocytes) and an increase in the number of PBLs expressing CD25 [interleukin (IL)-2 receptor] or CD69 compared with controls, with no variations in the expression of CD71 (transferrin receptor). All these changes were related to the total lifetime dose of ethanol consumed, suggesting a dose-dependent effect of alcohol in the immune system.

SUBJECTS AND METHODS

Patient and Control Selection

Over an 8-month period, a total of 215 with chronic alcoholism (DSM-III-R) were seen in the Alcoholism Unit of the Hospital Clinic of Barcelona. This unit deals with ambulatory patients who seek assistance in terminating their dependence on alcohol, but who do not suffer from other overt diseases. On the Monday of each week, the first male patient to register with a daily ethanol intake >100 g in the previous 2 years up to the day prior to admission was selected for study. Initially, 35 patients were included. Among these patients, 1 had cirrhosis, 3 had alcoholic hepatitis, and 1 had malnutrition. These five patients were excluded, leaving a total of 30 male alcoholics to be studied. The patients were all Caucasian males of Spanish descent who lived with their families in or around Barcelona and had histories of stable employment. None of the patients studied was indigent. No patients nor controls objected to being in the study, and all gave informed consent for the various procedures. The study protocol was approved by the Institutional Review Board.

Controls

This group included patients admitted to the Traumatology Department of our Hospital for different surgical procedures (mainly knee

From the Department of Internal Medicine (E.S., R.E., J.F.-S., E.A., A.U.-M.) and Laboratory of Immunology (A.G.), Hospital Clínic i Provincial, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received for publication September 4, 1997; accepted January 14, 1998

This study was supported in part by Grant FIS 94/1114.

Reprint requests: Ramón Estruch, M.D., Hospital Clínic i Provincial, Department of Internal Medicine, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain.

Copyright © 1998 by The Research Society on Alcoholism.

arthroscopies). They reported drinking <20 g of ethanol/week and were matched for sex (male) and age (± 3 years) with the alcoholic patients. Members of this control group were studied in the same way as alcoholics.

Exclusion Criteria

Alcoholic and control patients were excluded from the study if they met one of the following criteria: human immunodeficiency virus infection or other causes of immunodeficiency, cirrhosis, alcoholic hepatitis, malnutrition, neoplastic diseases, acute infectious diseases, consumption of drugs with effect on immunity (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, immunosuppressants), or chronic diseases (such as diabetes mellitus).

Clinical, Laboratory, and Nutritional Studies

A detailed clinical history of ethanol intake and dietary habits was obtained by two physicians (E.S. and J.F.-S.) using a structured questionnaire. Data were confirmed on consultation with family members.²¹ The average quantities per year and frequency of ethanol intake were recorded.

Within 24 hr of admission to the hospital, blood samples were obtained for measurements of markers of alcohol intake and nutritional status. These included hemoglobin, lymphocyte count, total protein, albumin, prealbumin, retinol-binding protein, transferrin, serum aspartate and alanine aminotransferases, γ -glutamyl transpeptidase, red cell and serum folate, vitamin B₁₂, and transketolase activity. The levels of ethanol in blood and urine, as well as serum antibodies against human immunodeficiency virus (ELISA), were determined in all patients.

Hepatic ultrasonography and percutaneous needle liver biopsy were performed in all patients with a previous history of liver disease, hepatomegaly on physical examination, and/or laboratory data of chronic hepatocellular failure.

Overall nutrition was assessed in terms of actual to ideal weight ratio.²² The lean body mass was calculated from the circumference of the upper nondominant arm and the thickness of the tricipital skin fold.²³ Nutritional protein status was estimated according to the values obtained for lymphocyte count, hemoglobin, total protein, albumin, prealbumin, and retinol-binding protein. Caloric malnutrition was considered if the body weight was <90% of ideal weight and/or if lean body mass was >10% below the normal value.²⁴ Protein malnutrition was considered if 3 of the 6 parameters mentioned herein were below normal values.²⁵ Diagnosis of mixed malnutrition was made when tests showed both protein and caloric malnutrition.

Immunological Studies

Separate aliquots of blood were drawn 24 hr after the last alcoholic drink and were processed immediately. Part of this blood was used to obtain serum and another part to perform lymphocyte immunophenotyping.

Lymphocyte Immunophenotyping. Cells were prepared by a hypotonic lysis technique and stained with fluorescein or phycoerythrin-tagged monoclonal antibodies [Becton-Dickinson (Mountain View, CA) and Dako (Dakopatts, Denmark)] for two-color and single-color flow cytometry. Fluorescence analysis was conducted by means a FACScan analyzer equipped with a Consort 30 data analysis system (Becton-Dickinson). The lymphocyte populations analyzed (3000 \times sample) were isolated by side-angle and forward-angle scattering criteria. The following fluorescein-labeled monoclonal antibodies were used: Leu 3a (CD4), Leu 4 (CD3), antitransferrin receptor (CD71), and anti-UCHL1 (CD45RO) were purchased from Dako (Dakopatts, Denmark); Leu 18 (CD45RA) was purchased from Becton-Dickinson (Mountain View, CA). The phycoerythrin-labeled monoclonal antibodies used were: anti-HLA DR, Leu 2a (CD8), Leu 5b (CD2), Leu 12 (CD19), Leu M3 (CD14), and anti-TAC (CD25) from Dako; and Leu 19 (CD56) and Leu 23 (CD69) from Becton-Dickinson. In addition to the monoclonal antibodies listed herein, negative controls (fluorescein and phycoerythrin tagged) were used to provide a baseline for flow cytometry.

Serum ILs. IL-6 and soluble IL-2 receptor (sIL-2r) serum levels were measured by using a commercially available ELISA kit (Immunotech, Marseille, France). The threshold sensitivity of the assays was 3 pg/ml and 210 pg/ml for IL-6 and sIL-2r, respectively.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SPSS-PC statistical software.²⁶ Differences between groups were analyzed using the two-tailed *t* test, the χ^2 test, and Fisher's exact test. Correlation studies were obtained by Pearson's correlation coefficient and regression analyses. All variables are expressed as mean \pm SD. Statistical significance was considered if the *p* value was <0.05.

RESULTS

Clinical and Laboratory Data

The 30 alcoholic patients and their matched controls had a mean age of 41 ± 8 and 39 ± 9 years, respectively. Chronic alcoholics reported a daily ethanol intake between 100 and 300 g (mean: 204 ± 76 g/day) during a period of 20.9 ± 9.8 years. The mean total lifetime dose of ethanol was 19.9 ± 10.6 kg of ethanol/kg of body weight. The pattern of drinking was continuous excessive ethanol intake as a part of everyday life. Fifteen alcoholic patients and 12 controls had smoked 1 to 2 packets of cigarettes a day since the second decade of their lives (*p* = NS). None of the subjects used any other drugs. Clinical and nutritional data of both groups are described in Table 1.

Serum γ -glutamyltranspeptidase and mean corpuscular value were significantly higher in the alcoholic group than in the controls (*p* < 0.001). No differences were observed in the remaining parameters analyzed between the two groups.

Nutritional Status and ALD

None of the alcoholic patients had clinical or laboratory evidence of malnutrition, although the mean circumference of the upper nondominant arm and the thickness of the tricipital skin fold were lower in the chronic alcoholics than in the controls (*p* < 0.05, both). The percentages of ideal weight (113 ± 23 vs. $108 \pm 16\%$) and lean body mass (52.7 ± 7.5 vs. 53.3 ± 3.7 kg) was similar in both groups. Only two alcoholic patients had a low level of prealbumin, and another three had a low level of retinol-binding protein. Thus, none of the 30 alcoholic patients and 30 controls showed evidence of caloric or protein malnutrition.

Physical examination disclosed mild hepatomegaly in four alcoholic patients. Two of these also had data indicating chronic hepatocellular failure. Two additional patients maintained serum aminotransferases at a level >120 units/liter after 2 months of complete ethanol abstinence. Liver biopsy performed in these six patients showed fatty liver and alcoholic hepatitis in three patients, one patient showed cirrhosis, and two biopsies were normal. The former four patients were excluded from the analysis.

Table 1. Clinical and Nutritional Data of 30 Chronic Alcoholics without Ethanol-Related Diseases and Their Matched Controls

	Alcoholics (n = 30)	Controls (n = 30)	p value
Age (yr)	41 ± 8	39 ± 9	NS
Daily ethanol intake (g/day)	204 ± 76	—	
Total lifetime dose of ethanol (kg of ethanol/kg of body weight)	19.9 ± 10.6	—	
Smokers (n)	15	12	NS
Percentage of ideal weight (%)	113 ± 23	108 ± 16	NS
Lean body mass (kg)	52.7 ± 7.5	53.3 ± 3.7	NS
Lymphocyte count (cells/mm ³)	1967 ± 587	2099 ± 670	NS
Hemoglobin (g/liter)	145 ± 14	146 ± 11.6	NS
Total protein (g/liter)	70.5 ± 7	68.6 ± 3.7	NS
Albumin (g/liter)	42.1 ± 4.6	42.4 ± 2.8	NS
Prealbumin (mg/dl)	31.6 ± 8.6	30.9 ± 4.5	NS
Retinol-binding protein (mg/dl)	5.2 ± 2.2	4.9 ± 0.7	NS

n, number of cases; NS, not significant.

Immunological Studies

Lymphocyte Subsets. We observed a significant decrease in the CD19⁺ subset in absolute (165 ± 80 vs. 289 ± 141 cells/mm³, p < 0.001) and relative counts (8.4 ± 4 vs. 13.1 ± 4%, p < 0.001) in the alcoholic patients, compared with the controls. Moreover, relative values of the CD3 and CD45RO⁺ subsets were also higher in the alcoholic group, compared with controls. No differences were obtained in the remaining lymphocyte subsets. The percentages of the lymphocyte subsets are detailed in Table 2.

Expression of Lymphocyte Activation Antigens. A significantly higher number of lymphocytes expressed CD69 (116 ± 41 vs. 171 ± 79 cells/mm³, p = 0.006) and CD25 (505 ± 207 vs. 652 ± 255 cells/mm³, p = 0.02) in alcoholics, compared with controls. The relative values of CD2⁺, class II⁺ subset were also higher (p < 0.05) in patients with chronic alcoholism. No differences were observed in CD71 expression between both groups (10.6 ± 6 vs. 9.9 ± 4.1%, p = 0.637). The percentages of lymphocytes expressing activation antigens are reported in Table 3.

Serum ILs. The existence of a higher number of activated PBLs in alcoholics was verified by an increase of sIL-2r (activation marker of mononuclear cells) in chronic alcoholics, compared with controls (87.8 ± 37.3 vs. 58.3 ± 25.6 pM, p = 0.04). Moreover, we measured the IL-6 serum level to assess whether activated PBLs of alcoholics increased IL-6 production, but no differences were observed between both groups (70.8 ± 60 vs. 57.4 ± 45 pM, p = 0.5).

Relationship between Ethanol Consumption and Expression of Lymphocyte Activation Antigens. Those patients who reported a daily ethanol intake >200 g/day showed a significantly higher percentage of PBLs expressing CD25 than their counterparts (p = 0.002). In addition, those alcoholics with a total lifetime dose of ethanol >15 kg of ethanol/kg of body weight presented a significantly higher percentage of PBLs expressing CD25 (p = 0.01) and a significantly lower percentage of PBLs expressing CD71 (p = 0.01) than their counterparts. In a manner consistent with these findings, a highly significant positive correlation between percentage of PBLs expressing CD25 with daily ethanol intake (r =

Table 2. % of PBL Subsets in a Group of 30 Alcoholic Patients Compared with 30 Healthy Matched Controls

	Alcoholics (n = 30)	Controls (n = 30)	p value
CD2 ⁺	81.1 ± 5.4	79.9 ± 4.5	0.395
CD3 ⁺	74.7 ± 6	70.9 ± 6.5	0.029
CD4 ⁺	47.1 ± 9.5	43.7 ± 6.8	0.138
CD8 ⁺	29.5 ± 9	30.8 ± 5.7	0.508
CD14 ⁺	11.2 ± 7.7	10.3 ± 4.8	0.678
CD19 ⁺	8.4 ± 4	13.1 ± 4	0.000
CD45RO ⁺	55.3 ± 10.7	47.6 ± 9.7	0.010
CD45RA ⁺	56.2 ± 12.6	62.3 ± 12.7	0.163
CD56 ⁺	10.2 ± 3.8	10.9 ± 5.2	0.598

n, number of cases.

Table 3. % of PBLs that Express Activation Antigens in Both Groups of Patients

	Alcoholics (n = 30)	Controls (n = 30)	p value
CD69	8.5 ± 2.2	5.4 ± 2	0.001
CD25	31.7 ± 7.6	25 ± 7.6	0.007
CD71	10.6 ± 6	9.9 ± 4.1	0.637
HLA-DR	27.1 ± 10.1	26 ± 8.8	0.710

n, number of cases.

0.56, p < 0.001) (figure 1) and total lifetime dose of ethanol (r = 0.48, p < 0.01) was also observed. On the other hand, there was a positive correlation between HLA-DR expression in the CD2⁺ subset (T lymphocytes) and total lifetime dose of ethanol (r = 0.42, p < 0.04), whereas CD71 expression in PBLs correlated negatively with the total lifetime dose of alcohol (r = -0.39, p < 0.04).

DISCUSSION

In the current study, a significant decrease in the CD19⁺ subset (B cells) in PBLs of alcoholic patients was observed, compared with controls (p = 0.001). Moreover CD3⁺ (T lymphocytes) and CD45RO⁺ (memory cells) subsets were slightly increased in the same patients. No differences were detected in the percentage of natural killer cells (CD56⁺), helper cells (CD4⁺), cytotoxic cells (CD8⁺), naive cells

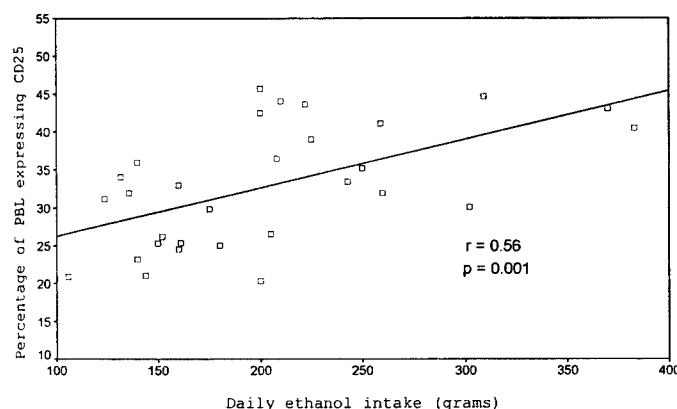


Fig. 1. Correlation between daily ethanol intake and percentage of PBLs expressing CD25 in a group of 30 well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases.

(CD45RA⁺), and monocytes (CD14⁺ cells) between both groups. In addition, activation antigens such as CD25 and CD69 were expressed in a higher number of PBLs (increase in 33 and 50%, respectively) in alcoholic patients. However, CD71 (transferrin receptor) was expressed in similar percentages in both groups of patients, and HLA-DR expression was higher in T lymphocytes (CD2⁺) of alcoholic patients, but not in total lymphocytes. This is because HLA-DR is a molecule basally expressed in B cells that were significantly decreased in the chronic alcoholics studied. All of these changes, with the high serum level of sIL-2r detected in chronic alcoholics, suggest a basal activation of T cells in these patients.²⁷⁻²⁹

Lymphocyte subsets and expression of activation antigens in peripheral blood in chronic alcoholics have been reported in several studies.^{7,8,10,16-20} Up to now, the results obtained have been controversial, because some authors did not observe differences in CD2⁺,^{7,8} CD4⁺,^{7,8,16} CD8⁺,^{7,8,16,19} CD19⁺,^{7,16} or CD56⁺,⁷ subsets, whereas other authors detected differences in CD3⁺,^{10,16,19} CD19⁺,¹⁰ CD4⁺,^{10,19} CD8⁺,^{10,17} or CD56⁺,¹⁶ cells between alcoholics and controls. Recently, Cook et al.^{18,30} find changes in some subpopulations of the CD19⁺, CD4⁺, or CD8⁺ subsets of chronic alcoholics. Similarly, the expression of activation antigens in PBLs are contradictory. Some articles, have observed a higher expression of CD25, CD71, or HLA-DR,^{8,16,17} whereas no differences have been observed in others.¹⁹ However, most of these studies did not take into account the effect of ALD or malnutrition in the immune system.^{7,8,10,16-19} In fact, some studies have only enrolled patients with alcoholic cirrhosis⁸ or alcoholic hepatitis.¹⁹ Heterogeneity of the alcoholic population studied could be the cause of the confusing results obtained.

In the current study, only well-nourished alcoholic patients without ALD were included. Moreover, some confusing factors that can influence lymphocyte subsets or expression of activation antigens (such as smoking habit, age, or coexistence of chronic diseases) were also controlled.³¹⁻³⁴ Thus, the main variable differentiating patients and controls were the ethanol consumption of the former. In addition, the dose-dependent relationship between alcohol consumption and the percentage of PBLs expressing CD25 (positive) and CD71 (negative) observed in our study suggest a direct effect of alcohol in the immune cells.

Previous reports have detected a worse immunization status after hepatitis B vaccination³⁵ and a higher incidence of community-acquired pneumonia⁴ in alcoholic patients, compared with nondrinking patients; that fact may be explained by the decreased count of the CD19 subset observed in the well-nourished alcoholics examined in the present study.

Upon stimulation of resting (G0 phase) lymphocytes, T cells produce IL-2 and express IL-2 receptor (G1 phase). Interaction of IL-2 with its receptor on activated T cells leads to expression of the transferrin receptor (CD71). In the late G1 phase, binding of serum transferrin to its cel-

lular receptor is required for T cells to undergo the G1-S phase transition.^{36,37} If the process goes on, cell proliferation can be achieved. In the current study, we have observed higher percentages of PBLs expressing CD25 or CD69 and higher levels of sIL-2r in chronic alcoholics. Those findings are characteristic of the early phases of T-cell activation. However, the absence of increase in CD71 expression suggests that the activation process is not fully developed and, consequently, proliferation is not achieved in those lymphocytes.^{29,36,37} Dysregulation of CD71 expression could explain why stimulated lymphocytes of alcoholic patients show a worse proliferative response than lymphocytes of control patients.⁹ The association of "activated lymphocytes" and poor proliferative response has previously been reported in alcoholic cirrhosis.⁸ In addition, we have not detected differences in IL-6 production between alcoholics and controls. All these findings suggest that in alcoholics "phenotypic activation" (CD69 and CD25 expression) does not correlate with "functional activation" (IL-6 production or proliferation) of lymphocytes.

In summary, well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases exhibit significant changes in lymphocyte subsets of peripheral blood. The CD19⁺ subset (B lymphocytes) was significantly lower in chronic alcoholics. In addition, an increase in the expression of activation antigens (CD25, CD69, and HLA-DR) in PBLs was observed, whereas other antigens, such as CD71, were unaffected, thus leading to the denomination of "incomplete activation state." This situation may explain the poor proliferative response of PBLs in alcoholic patients after mitogen stimulation. The key question, however, concerns the mechanism of lesion due to ethanol. It remains to be discovered whether changes in the immune system are due to a direct effect of ethanol on the immune cells: disorders in cellular transduction signals and alterations in membrane fluidity.³⁸ On the other hand, a deleterious effect of ethanol could also be explained through a dysfunction in cytokine secretion or neuroendocrine axis regulation.⁵

REFERENCES

1. Adams HG, Jordan C: Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am* 68:179-202, 1984
2. Mufti SJ, Darban HR, Watson RR: Alcohol cancer and immunomodulation. *Crit Rev Oncol Hematol* 9:243-261, 1989
3. Shields PG, Harris CC: Principles of carcinogenesis: Chemical, in de Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, JB Lippincott, 1993, p 200
4. Fernandez-Solà J, Junqué A, Estruch R, Monforte R, Torres A, Urbano-Márquez A: High alcohol intake as a risk prognostic factor for community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 155:1649-1654, 1995
5. Watson RR, Brogs P, Witte M, McCuskey RS, Lantz C, Johnson MI, Mufti SI, Earnest DL: Alcohol, immunomodulation and disease. *Alcohol Alcohol* 29:131-139, 1994
6. Estruch R, Nicolás JM, Villegas E, Junqué A, Urbano-Márquez A: Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol Alcohol* 28:543-550, 1993
7. Watson RR, Jackson JC, Hartmann B, Sampliner R, Mobley D,

Eskelson C: Cellular immune functions, endorphins and alcohol consumption in males. *Alcohol Clin Exp Res* 9:248–254, 1985

8. Deviere J, Denys C, Schandene L, Romasco F, Adler M, Wybran J, Dupont E: Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 72:377–382, 1988
9. Mutchnick MG, Lee HH: Impaired lymphocyte proliferative response to mitogen in alcoholic patients. Absence of a relation to liver disease activity. *Alcohol Clin Exp Res* 12:155–158, 1988
10. Mili F, Flanders D, Boring J, Annest JL, DeStefano F: The associations of alcohol drinking and drinking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. *Alcohol Clin Exp Res* 16:688–694, 1992
11. Roselle GA, Mendenhall CL, Grossman CJ: Ethanol and soluble mediators of host response. *Alcohol Clin Exp Res* 13:494–498, 1989
12. Martinez F, Abril ER, Earnest DL, Watson RR: Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol* 9:455–458, 1992
13. Deviere J, Content J, Denys C, Vandebussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E: High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol* 77:221–225, 1989
14. Martinez F, Thomas N, Darban H, Cox T, Wood S, Watson RR: Interleukin-6 and interleukin-8 production by mononuclear cells of chronic alcoholics during treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 17:1193–1197, 1993
15. Khoruts A, Stahnke L, McClain C, Logan G, Allen JI: Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13:267–276, 1991
16. Cook RT, Garvey MJ, Booth BM, Goeken JA, Stewart B, Noel M: Activated CD8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol* 11:246–253, 1991
17. Kronfol Z, Nair M, Hill E, Kroll P, Brower K, Greden J: Immune functions in alcoholism: A controlled study. *Alcohol Clin Exp Res* 17:279–283, 1993
18. Cook RT, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Cook BL, Booth BM, Stewart BC, Garvey MJ: Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leukocyte common antigen and B-integrin. *Alcohol Clin Exp Res* 18:71–80, 1994
19. Ishimaru H, Matsuda T: T cell subsets (Tc, Th, Ts, Tsi) and IL-2 receptor bearing cells in peripheral blood of patients in the acute phase of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol* 25:353–358, 1990
20. Cook RT, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Vandersteen D, LaBrecque DR, Cook BL: Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:555–563, 1995
21. Sobell LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM: Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behaviors. *Behav Res Ther* 17:157–160, 1979
22. Jelliffe DB: The Assessment of the Nutritional Status of the Community. Monograph Series No. 53. Geneva, World Health Organization, 1966
23. Bishop CW, Bowen PE, Ritchey SJ: Norms for nutritional assessment of American adult by upper arm anthropometry. *Am J Clin Nutr* 34:2530–2539, 1981
24. Nicolás JM, Estruch R, Antúnez E, Sacanella E, Urbano-Márquez A: Nutritional status in chronically alcoholic men from the middle socio-economic class and its relation to ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 28:551–558, 1993
25. Burrit MF, Anderson CF: Laboratory assessment of nutritional status. *Human Pathol* 15:130–133, 1984
26. Nie NH, Hull CD, Jenkins JG, Steinbrenner K, Bent DH: Statistical Package for the Social Sciences. New York, McGraw-Hill, 1975
27. Rubin LA, Nelson DL: The soluble interleukin-2 receptor: Biology, function and clinical application. *Ann Intern Med* 113:619–627, 1990
28. Obara T, Vodian MA, Kung PC: Clinical significance of soluble interleukin 2 receptor for monitoring diseases associated with activated lymphocytes and viral infections. *J Clin Lab* 6:423–433, 1992
29. Weiss A: T-lymphocyte activation, in Paul WE (ed): *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press Ltd., 1993, p 467
30. Cook RT, Waldschmidt TJ, Cook BL, LaBrecque DR, McLatchie K: Loss of the CD5⁺ and CD45RA^{hi} B cell subsets in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 103:304–310, 1996
31. Hockertz S, Emmendorffer A, Scherer G, Ruppert T, Daube H, Tricker AR, Adlkofer F: Acute effects of smoking and high experimental exposure to environmental tobacco smoke (ETS) on the immune system. *Cell Biol Toxicol (Netherlands)* 10:177–190, 1994
32. Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E: Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 82:1601–1604, 1993
33. Dekaris D, Sabioncello A, Mazuran R, Rabatic S, Svoboda-Beusan I, Racunica NL, Tomasic J: Multiple changes of immunologic parameters in prisoners of war. Assessments after release from a camp in Manjaca, Bosnia. *JAMA* 270:595–599, 1993
34. Spooren PF, Vermes I, Soons JW: Similar alterations of lymphocyte subpopulations in type I and type II diabetes. *Neth J Med (Netherlands)* 42:163–167, 1993
35. Nalpas B, Thepot V, Driss F, Pol S, Courouce AM, Saliou P, Berthelot P: Secondary immune response to hepatitis B virus vaccine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17:295–298, 1993
36. Reed JC, Alpers JD, Nowell PC, Hoover RG: Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3982–3986, 1986
37. Crabtree GR: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243:355–361, 1989
38. Hoek JB, Rubin E: Alcohol and membrane associated signal transduction. *Alcohol Alcohol* 25:143–156, 1990

TRABAJO 2: HIPEREXPRESIÓN DE MOLÉCULAS VLA Y CD29 EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE ALCOHÓLICOS CRÓNICOS SIN PATOLOGÍA ASOCIADA AL ALCOHOLISMO.

Up-regulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases.

E. Sacanella, R. Estruch, A. Gayà, K Ferrer, J. Fernández-Solá, JR. Alonso, JM. Nicolás, A. Urbano-Márquez.

Alcohol Clin Exp Res 22:371-375, 1999.

Upregulated Expression of VLA Proteins and CD29 in Peripheral Blood Lymphocytes of Chronic Alcoholics Without Ethanol-Related Diseases

E. Sacanella, R. Estruch, A. Gaya, K. Ferrer, J. Fernández-Sola, J. R. Alonso, J.M. Nicolás, and A. Urbano-Márquez

To analyze adhesion molecule expression on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and on different lymphocyte subpopulations (CD2⁺, CD8⁺, CD19⁺, and CD56⁺ subsets) in chronic alcoholism, 30 well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases and 30 matched controls were included in the study. Adhesion molecules that mediate adhesion to other cells and to extracellular matrix proteins, and whose cellular expression is modified during lymphocyte activation, were selected for study. A detailed clinical evaluation, laboratory analysis, nutritional assessment, and study of adhesion molecule expression was performed. A significant higher expression of CD29 (β_1 -integrin) ($p = 0.001$), VLA-3 ($p = 0.002$), VLA-4 ($p = 0.03$), and VLA-5 ($p = 0.001$) were observed on PBMCs of chronic alcoholics, compared with control subjects, whereas no changes were observed in CD18 (β_2 -integrin) and CD50 (ICAM-3) expression. The upregulation of CD29 and VLA proteins only affected T lymphocytes (CD2⁺/CD8⁺/CD4⁺ cells). These data confirm that T cells of chronic alcoholics are basally activated and that changes in adhesion molecule expression on PBMCs may be responsible of disturbances of adhesion processes in chronic alcoholics without ethanol-related diseases.

Key Words: Adhesion Molecules, Integrins, Chronic Alcoholism, CD50, VLA.

CHRONIC ALCOHOLIC patients show a higher incidence of neoplastic (mainly of upper respiratory and digestive tracts)¹ and infectious (community-acquired pneumonia and tuberculosis)^{2,3} diseases than the abstaining population. Although the mechanisms responsible for this fact are unknown, many hypotheses have pointed out that an immune dysfunction induced by chronic ethanol intake^{1,4} may play a role in the pathogenesis of these complications. In addition, it has been suggested that even alcoholic liver disease (alcoholic hepatitis and cirrhosis) may be mediated by immunological mechanisms.⁵⁻⁸

In this respect, many studies have evaluated the lymphocyte activation process in chronic alcoholics, including the proliferative response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to different mitogens,^{9,10} interleukin synthe-

sis,^{11,12} and expression of activation antigens on lymphocyte membranes.¹³⁻¹⁵ T-lymphocyte activation induces changes in the expression of adhesion molecules, which can modify the ability of lymphocytes to interact with their environment and to migrate from the circulation to tissues.¹⁶⁻¹⁹ However, few studies have been focused on the analysis of adhesion molecule expression in PBMCs of chronic alcoholics without ethanol-related diseases.^{20,21}

Therefore, we embarked on a study to analyze the expression of adhesion molecules capable of mediating adhesion to different cell types [CD18, VLA-4, and intracellular adhesion molecules-3 (ICAM-3)] and to extracellular matrix proteins (CD29, VLA-3, VLA-4, and VLA-5) on PBMCs and lymphocyte subsets in a group of 30 alcoholic patients without alcoholic liver disease (ALD), compared with a control group of 30 nondrinking patients. We observed a significantly higher expression of VLA-3, VLA-4, VLA-5, and CD29 (β_1 -integrin) on PBMCs from alcoholic patients than on PBMCs from control patients. Nevertheless, CD50 (ICAM-3) and CD18 (β_2 -integrin) expressions were similar in both groups. The higher expression of VLA proteins and CD29 affected T lymphocytes exclusively, whereas we could not detect any difference in the expression of these molecules in the CD19⁺ (B lymphocytes) or in the CD56⁺ subset [natural killer (NK) cells]. These findings confirm that T lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases are basally activated and suggest that adhesion molecule expression is altered in these patients.

METHODS

Patient and Control Selection

Over a 12-month period, a total of 420 patients with chronic alcoholism (DSM-III-R) were seen in the Alcoholism Unit of our institution. This unit deals with ambulatory patients who seek assistance in terminating their dependence on alcohol, but who do not suffer from other overt diseases. On the Monday of each week, the first male patient to register with a daily ethanol intake >100 g in the previous 2 years up to the day before admission was selected for study. Initially, 37 patients were included. Among these patients, two had cirrhosis, four alcoholic hepatitis and one malnutrition, and were excluded from the study leaving a total of 30 male alcoholics.

Control subjects were obtained among medical and auxiliary personnel of our hospital who reported an ethanol intake <20 g/week. These subjects were matched for gender (male) and age (± 3 years) with the alco-

From the Department of Internal Medicine (E.S., R.E., K.F., J.F.-S., J.R.A., J.M.N., A.U.-M.) and Laboratory of Immunology (A.G.), Hospital Clinic Universitari, Institut d'Investigació Biomèdica Agustí Pi Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received for publication August 11, 1998; accepted December 3, 1998

This study was supported in part by Grant FIS 94/1114.

Reprint requests: R. Estruch, M.D., Hospital Clinic i Universitari, Department of Internal Medicine, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain.

FAX: 34-3-227.55.39

Copyright © 1999 by The Research Society on Alcoholism.

holic patients and were studied in the same way as the alcoholics. All patients and controls were Caucasian males of Spanish descent who lived with their families in or around Barcelona and had histories of stable employment. No patients nor controls objected to being in the study, and all gave informed consent for the various procedures. The study protocol was approved by our Institutional Review Board.

Exclusion Criteria

Alcoholic and control subjects were excluded from the study if they met one of the following criteria: human immunodeficiency virus infection or other causes of immunodeficiency, cirrhosis, alcoholic hepatitis (AH), malnutrition, neoplastic diseases, acute infectious diseases, consumption of drugs with effect on immunity (nonsteroidal antiinflammatory drugs, immunosuppressant, or chronic diseases, such as diabetes mellitus).

Clinical, Laboratory and Nutritional Studies

A detailed clinical history of ethanol intake and dietary habits was obtained by two physicians (E.S. and J.F.-S.) using a structured questionnaire, and data were confirmed on consultation with family members.²² The average quantities per year and frequency of ethanol intake were recorded.

Within 24 hr of admission to the hospital, blood samples were obtained for measurements of markers of alcohol intake and nutritional status. These included hemoglobin, lymphocyte count, total protein, albumin, prealbumin, retinol-binding protein, transferrin, serum aspartate and alanine aminotransferases, γ -glutamyltranspeptidase, red cell and serum folate, vitamin B₁₂, and transketolase activity. The levels of ethanol in blood and urine, as well as serum antibodies against human immunodeficiency virus (ELISA), were determined in all patients.

Hepatic ultrasonography and percutaneous needle liver biopsy were performed in all patients with previous history of liver disease, hepatomegaly on physical examination, and/or laboratory data of chronic hepatocellular failure.

Overall nutrition was assessed in terms of the proportion of actual to ideal weight.²³ The lean body mass was calculated from the circumference of the upper nondominant arm and the thickness of the tricipital skin fold.²⁴ Nutritional protein status was estimated according to the values obtained for lymphocyte count, hemoglobin, total protein, albumin, prealbumin, and retinol-binding protein. Caloric malnutrition was considered if the body weight was <90% of ideal weight and/or if lean body mass was >10% below the normal value.²⁵ Protein malnutrition was considered if four of the six parameters described were below normal values.²⁶

Immunological Studies

Chemicals and Monoclonal Antibodies. The following monoclonal antibodies were used: anti-VLA-3: P1B5 (IgG1), anti-VLA-4: P4G9 (IgG2b), anti-VLA-5: P1D6 (IgG3), and anti-CD29 (β_1 -integrin). All were purchased from Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). The CD50 (ICAM-3) monoclonal antibody 140-11 and 101.1D2 and the CD18 (β_2 -integrin) 68.5A5 were obtained in ascites form from hybridomas produced in the Laboratory of Immunology, Hospital Clinic (Barcelona, Spain) and the anti-mouse polyvalent immunoglobulin fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The phycoerythrin-labeled monoclonal antibodies used were: Leu 2a (CD8), Leu 5b (CD2), and Leu 12 (CD19) from Dako and Leu 19 (CD56) (from Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Mouse serum used to avoid nonspecific staining was purchased from Seralab (Sussex, UK). In addition to the monoclonal antibodies listed herein, negative controls (fluorescein and phycoerythrin-tagged) were used to provide a baseline for flow cytometry.

Cell Separation, Immunofluorescence Assays, and Flow Cytometry Analysis. PBMCs from healthy volunteers and alcoholics were isolated from whole blood by Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (density: 1.077 g/ml) gradient centrifugation. Cells were washed and resuspended at 2×10^6 cells/ml in phosphate-buffered saline. Indirect immunofluorescence assays were conducted as previously described by using a fluorescein

Table 1. Clinical and Nutritional Data of 30 Chronic Alcoholics Without Ethanol-Related Diseases and Their Matched Controls

	Alcoholics (n = 30)	Controls (n = 30)	Significance (p)
Age (years)	40.6 \pm 7.9	37.4 \pm 6.7	NS
Daily ethanol intake (g)	199 \pm 47	—	
Total lifetime dose of ethanol (kg of ethanol/kg of body weight)	18.67 \pm 7.2	—	
% of ideal weight	113.9 \pm 22.2	105.1 \pm 13.3	NS
Lean body mass (kg)	53.63 \pm 6.4	53.36 \pm 6	NS
Lymphocyte count (cells/mm ³)	1881 \pm 440	2075 \pm 462	NS
Hemoglobin (g/liter)	148.0 \pm 8.1	150 \pm 11.6	NS
Total protein (g/liter)	72.8 \pm 6.7	73.1 \pm 4.9	NS
Albumin (g/liter)	45.2 \pm 3.3	44.7 \pm 3.9	NS
Prealbumin (mg/dl)	32.4 \pm 9.4	30.5 \pm 4.9	NS
Retinol-binding protein (mg/dl)	5.7 \pm 1.7	4.9 \pm 0.7	NS

n = number of cases; NS, not significant.

isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin serum (Sigma). In a second step, cells were stained with a phycoerythrin-monoclonal antibody to identify several lymphocyte subsets by means of direct immunofluorescence assay. To avoid nonspecific staining, 10% of mouse serum (Seralab) was added before the cells were incubated with the phycoerythrin-labeled monoclonal antibody. Fluorescence analysis was conducted by means of a FACScan Clinical Cytometer equipped with a LYSIS II data analysis system (Becton-Dickinson). The lymphocyte populations analyzed (3000 cells/sample) were isolated by side-angle and forward-angle scattering criteria.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SPSS-PC 4.0 statistical software (SPSS, Chicago, IL).²⁷ Differences between groups were analyzed using the two-tailed *t* test, the χ^2 test, and Fisher's exact test. Correlation studies were obtained by Pearson's correlation coefficient and regression analysis. All variables are expressed as mean \pm SD. Statistical significance was considered when the *p* value was below 0.05.

RESULTS

Clinical and Laboratory Data

The 30 alcoholic patients and their matched controls had a mean age of 40.6 \pm 7.9 vs. 37.4 \pm 6.7 years, respectively. Chronic alcoholics reported a daily ethanol intake between 110 and 300 g (mean 199 \pm 47 g/day) during a period of 18.1 \pm 11.1 years. The mean total lifetime dose of ethanol was 18.67 \pm 7.16 kg of ethanol/kg of body weight. The pattern of drinking was continuous excessive ethanol intake as a part of everyday life. None of the subjects used any other drugs. The clinical and nutritional data of both groups are described in Table 1.

Serum γ -glutamyltranspeptidase and mean corpuscular value were significantly higher in the alcoholic group, compared with the controls (*p* < 0.001). No differences were observed in the remaining parameters analyzed between both groups.

Nutritional Status and ALD

None of the alcoholic patients had clinical or laboratory evidence of malnutrition, although the mean circumference of the upper nondominant arm and the thickness of the

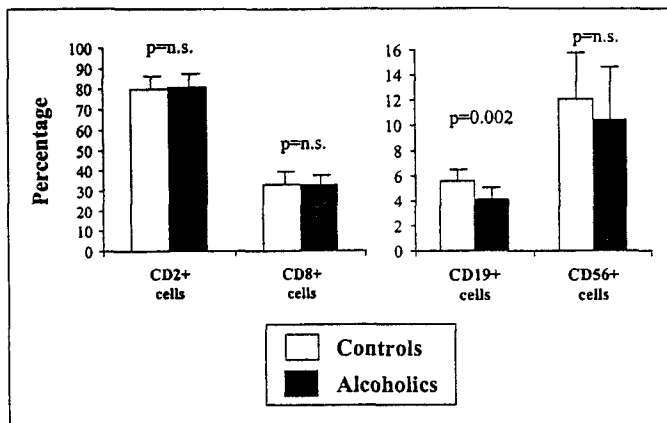


Fig. 1. Percentage of different lymphocyte subsets in peripheral blood in a group of 30 well-nourished chronic alcoholics and 30 matched controls. n.s., not significant.

tricipital skinfold were lower in chronic alcoholics than in controls ($p < 0.05$, both). Only four alcoholic patients had a slight lymphopenia, two had a low level of prealbumin and another two had a low level of retinol-binding protein. Thus, none of the 30 alcoholic patients and 30 controls showed evidence of caloric or protein malnutrition.

Physical examination disclosed mild hepatomegaly in five alcoholic patients. Four of these also had data indicating chronic hepatocellular failure. Two additional patients maintained serum aminotransferases at a level >120 units/liter after 2 months of complete ethanol abstinence. Liver biopsy performed in these seven patients showed fatty liver and alcoholic hepatitis in four patients, two patients showed cirrhosis, and one biopsy was normal. The former six patients were excluded from the analysis.

Immunological Studies

No significant differences in the percentage of cells expressing CD2, CD8, or CD56 were observed between alcoholic patients and controls. However, alcoholic patients had a significant decrease in CD19⁺ cells (B lymphocytes) with respect to controls ($4.1 \pm 1.5\%$ vs. $5.6 \pm 1.8\%$; $p = 0.002$). Figure 1 shows the percentage of these lymphocytes subsets in both groups of subjects.

Table 2 shows the results of the expression of adhesion molecules on PBMCs. Although the expression of CD18 (β_2 -integrin) and CD50 (ICAM-3) on PBMCs was similar in both groups, adhesion molecules belonging to the β_1 -integrin family (CD29, VLA-3, VLA-4, and VLA-5) were significantly hyperexpressed in alcoholic patients, compared with controls ($p < 0.03$, all).

Expression of Adhesion Molecules in Lymphocyte Subsets of Peripheral Blood. T Lymphocytes (CD2⁺ Cells). The percentage of T cells expressing CD18 and CD50 were similar in the two groups. We also studied antigen densities of CD18 and CD50 as determined by the mean fluorescence intensity on a flow cytometer. Mean fluorescence intensity of CD18 expression (245.9 ± 127.7 vs. $245.9 \pm$

Table 2. Percent of Adhesion Molecule Expression on PBMCs, CD2⁺ Subset (T Lymphocytes), and CD8⁺ Subset (Cytotoxic Cells) of 30 Alcoholic Patients and 30 Control Subjects

	Alcoholics	Controls	Significance (p)
PBMCs (%)			
CD18	88.1 ± 7.1	88.6 ± 6.8	0.420
CD50	87.9 ± 6.8	88.3 ± 7.6	0.861
CD29	65.6 ± 14.5	50.1 ± 19.6	0.001
VLA-3	24.0 ± 15.5	12.6 ± 10.2	0.002
VLA-4	26.2 ± 18.9	16.3 ± 14.3	0.027
VLA-5	49.9 ± 21.5	31.0 ± 18.6	0.001
CD2⁺ subset (%)			
CD29	59.5 ± 14.2	43.9 ± 19.2	0.001
VLA-3	19.6 ± 15.7	9.6 ± 9.3	0.001
VLA-4	20.7 ± 17	12.1 ± 11.9	0.041
VLA-5	44.1 ± 21.7	26.8 ± 17.7	0.002
CD8⁺ subset (%)			
CD29	25.6 ± 8.5	19.3 ± 9.0	0.022
VLA-3	5.4 ± 4.7	2.6 ± 2.3	0.036
VLA-4	13.1 ± 9.0	7.7 ± 7.4	0.048
VLA-5	19.3 ± 8.1	11.9 ± 9.5	0.01

127.7) and CD50 (289.4 ± 137.3 vs. 265.9 ± 124.3) was similar between alcoholics and controls. However, a higher percentage of T cells expressed CD29 ($p = 0.001$), VLA-3 ($p = 0.001$), VLA-4 ($p = 0.041$), and VLA-5 ($p = 0.002$) (Table 2).

Cytotoxic Lymphocytes (CD8⁺ Cells). The results are similar to those obtained in the CD2⁺ subset. The expression of CD50 and CD18 was similar in alcoholics and controls. However, the expression of CD29 ($p = 0.02$), VLA-3 ($p < 0.04$), VLA-4 ($p < 0.05$), and VLA-5 ($p = 0.01$) was significantly higher in alcoholic patients than in control subjects (Table 2).

B Lymphocytes (CD19⁺ Cells) and NK Cells (CD56⁺ Cells). B cells expressed similar percentages of CD18, CD50, VLA-3, VLA-4, and VLA-5 in both groups of subjects. Nevertheless, we observed a higher percentage of CD19⁺CD29⁺ cells in the control group. This is due to the presence of more CD19⁺ cells in the control group than in the alcoholic group. Thus, the ratio of CD19⁺ cells/CD19⁺CD29⁺ cells is similar in both groups ($91.3 \pm 10.9\%$ vs. $85.4 \pm 13.9\%$, $p > 0.05$). No differences were observed in the expression of any of the adhesion molecules studied in the CD56⁺ subset in both groups of subjects.

DISCUSSION

In this study, an upregulation in the expression of β_1 -integrin (CD29), as well as VLA proteins was observed on PBMCs from well-nourished alcoholic patients without ethanol-related diseases. More specifically, expression of CD29 (β_1 -integrin) ($p = 0.001$), VLA-3 ($p = 0.002$), VLA-4 ($p = 0.03$), and VLA-5 ($p = 0.001$) was significantly greater in patients with chronic alcoholism than in normal individuals. However, no differences were observed in the expression of CD18 (β_2 -integrin) and CD50 (ICAM-3) between both groups. On the other hand, when lymphocyte subsets were analyzed separately, the greater expression of CD29 and VLA proteins only affected T lymphocytes

(CD2⁺ cells) and cytotoxic lymphocytes (CD8⁺ cells), whereas B lymphocytes (CD19⁺ cells) and NK cells (CD56⁺ cells) expressed these adhesion molecules in similar percentages in alcoholics and controls.

Leukocyte adhesion molecules play a crucial role in cell-to-cell communication and allow lymphocytes to migrate from the circulation into tissue.¹⁷⁻¹⁹ This process is mediated through the interaction between leukocyte adhesion molecules with their counterreceptors on the endothelial cells.^{18,19} In alcoholic patients, adhesion molecules have been studied mainly in cases with severe ALD.^{5-8,28-31} Because infiltration of the liver by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells is a prominent feature of ALD [AH and alcoholic cirrhosis (AC), respectively], leukocyte adhesion molecules are inevitably involved in the pathogenesis of the disease.⁵⁻⁸ Thus, some authors have observed a higher expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular hepatic endothelium from patients with AH whereas vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and ICAM-1 were upregulated in vascular hepatic endothelium of patients with AC.^{5,7,8} However, no significant changes were observed in patients with alcoholic steatosis.⁷ In hepatocytes from patients with AH or AC, the expression of CD29 is greater than in those with alcoholic steatosis.⁶ Changes observed in the serum level of adhesion molecules correlated with the results obtained in tissue expression. Patients with AH showed higher serum levels of ICAM-1 and E-selectin, whereas patients with AC had greater serum levels of VCAM-1 and ICAM-1.^{5,8,28-30} Likewise, in patients with hepatic fibrosis, Yamauchi et al.³¹ detected higher serum levels of the vitronectin receptor (α -V β ₃) and VLA-5.³¹ All of these findings suggest that changes in adhesion molecule expression are preliminary, critical events in the development of severe ALD, and that the composition and intensity of the inflammatory infiltrate in the liver depend on the type of adhesion molecule expressed on the vascular hepatic endothelium.^{5,7,8}

In alcoholic patients without ethanol-related diseases (mainly ALD), studies of adhesion molecule expression are scarce.^{20,21} Cook et al.²¹ observed changes in the expression of L-selectin, CD11b (Mac-1), CD31, and CD57 in PBMCs of chronic alcoholics, compared with control patients. These changes mainly affected the CD8⁺ subset and, to a lesser extent, the CD4⁺ subset. The authors suggested that these changes could imply a loss of regulatory functions and a gain of cytotoxic potential in PBMCs of alcoholics.^{20,21} In our study, we selected some adhesion molecules that mediate adhesion to other cells and to extracellular matrix proteins, and whose cellular expression is modified during lymphocyte activation.^{16,17,19,32} We observed a significantly greater percentage of PBMCs expressing VLA proteins and CD29 (β ₁-integrin) in the alcoholic patients, compared with control subjects. By means of double immunofluorescence, we know that these cells with a higher expression of VLA proteins and CD29 were T lymphocytes.

Resting T lymphocytes bear small-to-moderate amounts

of VLA-3, VLA-4, and VLA-5; however, a significant increase of VLA proteins and CD29 is observed when lymphocyte activation is developed.^{16,17,19,32} Similarly, when naive T cells are stimulated by specific antigens, cells undergo a complex process of activation and differentiation, and thereafter become resting memory cells (CD45RO⁺). This transition is accompanied by an increased expression of adhesion molecules that modifies the ability of cells to communicate and interact with their environment.^{18,19,33} The findings of the present study are in agreement with previous results of our group. We found that chronic alcoholics without ethanol-related diseases had a greater percentage of memory T cells (CD45RO⁺) and that PBMCs of these patients are basally activated.¹⁵ This situation is manifested by means of the higher expression of lymphocyte activation antigens and adhesion molecules in alcoholic patients.^{13-15,20,21} The enhanced expression of integrins in chronic alcoholics could modify the capacity of adherence of PBMCs to other cells or to extracellular matrix proteins.¹⁶ In this sense, Chiappelli et al.³⁴ have demonstrated that ethanol diminishes CD18-mediated adhesion to an astrocyte cell substratum of normal human PBMCs in a dose-dependent manner. The upregulation of integrins may be a compensatory mechanism of the inhibitory effect produced by ethanol, such as have already been described in NMDA receptors of the central nervous system in alcohol-fed mice.³⁵ However, in the current study, expression of CD18 was similar in alcoholics and controls. On the other hand, enhanced expression of integrins could be explained as a result of the basal activation state of peripheral blood leukocytes (PBLs) of chronic alcoholics. However, both hypotheses cannot explain why upregulation of integrins is only observed in T cells and β ₁-integrins. This should be because different types of cells (T and B lymphocytes), and perhaps adhesion molecules (β ₁- and β ₂-integrins), can respond in a different way to the same stimulus.^{17,36,37}

In any case, the exact mechanism by which alcohol could modify the expression of adhesion molecules in PBL is unknown. Several authors have proposed that changes in the immune system seen in chronic alcoholics may be related to a dysregulation of the cytokine network^{4,38} or neuroendocrine axis,^{4,34,38} as well as a direct effect of ethanol or its metabolites^{1,39} on the immune cells.^{1,38,39}

In summary, the PBMCs of chronic alcoholic patients without ethanol-related diseases show changes in the expression of VLA-3, VLA-4, VLA-5, and CD29. These changes are only observed in T lymphocytes and may be related to a basal activation state of PBMCs in alcoholic patients and to the higher percentage of memory T cells (CD45RO⁺) of these patients. Further studies are necessary to define the mechanistic linkage between alcohol consumption and changes in adhesion molecule expression in PBL and whether these changes alter normal function of the immune system.

REFERENCES

1. Mufti SJ, Darban HR, Watson RR: Alcohol cancer and immunomodulation. *Crit Rev Oncol Hematol* 9:243-261, 1989
2. Fernandez-Solà J, Junqué A, Estruch R, Monforte R, Torres A, Urbano-Márquez A: High alcohol intake as a risk prognostic factor for community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 155:1649-1654, 1995
3. Nelson S, Mason C, Bagby G, Summer W: Alcohol, tumor necrosis factor and tuberculosis. *Alcohol Clin Exp Res* 19:17-24, 1995
4. Watson RR, Borgs P, Witte M, McCuskey RS, Lantz C, Johnson MI, Mufti SI, Earnest DL: Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol Alcohol* 29:131-139, 1994
5. Adams DH: Leucocyte adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 29:249-260, 1994
6. Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE, French SW, Chen TS, Morgan TR, the VA Cooperative Study Group 275: Expression of the β_1 chain (CD29) of integrins and CD45 in alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 88:1920-1927, 1993
7. Fisher N, Afford S, Adams DH: Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepato-gastroenterology* 43:1113-1116, 1996
8. Adams DH, Burra P, Hubscher SG, Elias E, Newman W: Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology* 19:588-594, 1994
9. Deviere J, Denys C, Schandene L, Romasco F, Adler M, Wybran J, Dupont E: Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 72:377-382, 1988
10. Mutchnick MG, Lee HH: Impaired lymphocyte proliferative response to mitogen in alcoholic patients. Absence of a relation to liver disease activity. *Alcohol Clin Exp Res* 12:155-158, 1988
11. Martinez F, Thomas N, Darban H, Cox T, Wood S, Watson RR: Interleukin-6 and interleukin-8 production by mononuclear cells of chronic alcoholics during treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 17:1193-1197, 1993
12. Khoruts A, Stahnke L, McClain C, Logan G, Allen JI: Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13:267-276, 1991
13. Cook RT, Garvey MJ, Booth BM, Goeken JA, Stewart B, Noel M: Activated CD8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol* 11:246-253, 1991
14. Kronfol Z, Nair M, Hill E, Kroll P, Brower K, Greden J: Immune functions in alcoholism: A controlled study. *Alcohol Clin Exp Res* 17:279-283, 1993
15. Sacanella E, Estruch R, Gayà A, Fernández-Solà J, Antúnez E, Urbano-Márquez A: Activated lymphocytes (CD25⁺ CD69⁺ cells) and decreased CD19⁺ cells in well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 22:897-901, 1998
16. Hemler ME: VLA proteins in the integrin family: Structures, functions and their role on leucocytes. *Annu Rev Immunol* 8:365-400, 1990
17. Shevach EM: Accessory molecules, in WE Paul (ed): *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press Ltd., 1993, pp 531
18. Adams DH, Shaw S: Leucocyte endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343:831-836, 1994
19. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-433, 1990
20. Cook RT, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Cook BL, Booth BM, Stewart BC, Garvey MC: Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leucocyte common antigen and β -integrin. *Alcohol Clin Exp Res* 18:71-80, 1994
21. Cook R, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Vandersteen D, LaBrecque DR, Cook BL: Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:555-563, 1995
22. Sobell LC, Maisto SA, Sobell MB, Cooper AM: Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behaviors. *Behav Res Ther* 17:157-160, 1979
23. Jelliffe DB: *The Assessment of the Nutritional Status of the Community*. Geneva: World Health Organization. Monograph series no. 53, 1966
24. Bishop CW, Bowen PE, Ritchey SJ: Norms for nutritional assessment of American adult by upper arm anthropometry. *Am J Clin Nutr* 34:2530-2539, 1981
25. Nicolás JM, Estruch R, Antúnez E, Sacanella E, Urbano-Márquez A: Nutritional status in chronically alcoholic men from the middle socioeconomic class and its relation to ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 28:551-558, 1993
26. Burrit MF, Anderson CF: Laboratory assessment of nutritional status. *Human Pathol* 15:130-133, 1984
27. Nie NH, Hull CD, Jenkins JG, Steinbrenner K, Bent DH: *Statistical Package for the Social Sciences*. New York, McGraw-Hill, 1975
28. Nagy I, Mandi Y: Serum and ascitic levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 in patients with alcoholic liver cirrhosis: Relation to biochemical markers of disease activity and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 20:929-933, 1996
29. Ishii K, Furedera S, Kumashiro R, Seo J, Koga Y, Sata M, Tanikawa K: Role of serum interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in the severity of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol* 29:81-85, 1994
30. Shimada S, Yamauchi M, Toda G: Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 28:S1B 47-51, 1993
31. Yamauchi M, Mizuhara Y, Toda G: Serum vitronectin receptor in alcoholic liver disease: Correlation with fibronectin receptor and morphological features. *Alcohol Alcohol* 28:S1A 37-43, 1993
32. Pino-Otín MR, Viñas O, de la Fuente MA, Juan M, Font J, Torradeflot M, Pallafes L, Lozano F, Alberola-Ila J, Martorell J, Yagüe J, Vives J, Gayà A: Existence of a soluble form of CD50 (intercellular adhesion molecule-3) produced upon human lymphocyte activation. Present in normal human serum and levels are increased in the serum of systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 154:3015-3024, 1995
33. Pino-Otín MR, Juan M, de la Fuente MA, Viñas O, Martínez-Cáceres E, Fernández MD, Miralles A, Vilella R, Yagüe J, Vives J, Gayà A: CD50 (intercellular adhesion molecule-3) is expressed at higher levels on memory than on naive human T cells but induces a similar calcium mobilization on both subsets. *Tissue Antigens* 46:32-44, 1995
34. Chiappelli F, Kung M, Lee P, Pham L, Manfrini E, Villanueva P: Alcohol modulation of human normal T-cell activation, maturation and migration. *Alcohol Clin Exp Res* 19:539-544, 1995
35. Grant KA, Valverius P, Hudspeth M, Tabakoff B: Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 176:289-296, 1990
36. Alsinet E, Inglés-Esteve J, Vilella R, et al: Differential effects of anti-CD45 monoclonal antibodies on human B cell proliferation: A monoclonal antibody recognizing a neuraminidase-sensitive epitope of the T200 molecule enhances anti-immunoglobulin-induced proliferation. *Eur J Immunol* 20:2801-2804, 1990
37. Martorell J, Rojo I, Martínez-Caceres E, Vives J: CD27 induction on thymocytes. *J Immunol* 145:1356-1363, 1990
38. Roselle GA, Mendenhall CL, Chedid A, Moritz TE, Gartside P: Alcohol modulation of immune function: Clinical and experimental data. *Alcohol Clin Exp Res* 19:551-554, 1995
39. Israel Y, Orrego H, Niemela O: Immune response to alcohol metabolites: Pathogenic and diagnostic implications. *Semin Liver Dis* 8:81-90, 1988

TRABAJO 3: EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INCREMENTA LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN SOLUBLES ENDOTELIALES/LEUCOCITARIAS E-SELECTINA E ICAM-1.

Chronic alcohol consumption increases serum levels of circulating endothelial cell/leucocyte adhesion molecules: E-Selectin and ICAM-1.

E. Sacanella, R. Estruch, E. Badía, J. Fernández-Solá, JM. Nicolás, A. Urbano-Márquez. Alcohol Alcohol (en prensa, 1999).

RAPID COMMUNICATION

CHRONIC ALCOHOL CONSUMPTION INCREASES SERUM LEVELS OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELL/LEUCOCYTE ADHESION MOLECULES E-SELECTIN AND ICAM-1

E. SACANELLA, R. ESTRUCH*, E. BADÍA, J. FERNÁNDEZ-SOLA, J. M. NICOLÁS and A. URBANO-MÁRQUEZ

Department of Internal Medicine. Hospital Clínic. Institut d'Investigació Biomèdica Agustí Pi Sunyer (IDIBAPS) University of Barcelona, Barcelona, Spain

(Received 29 January 1999; in revised form 12 April 1999; accepted 24 April 1999)

Abstract — A group of 30 chronic alcoholics without alcohol-related diseases and 30 controls (teetotallers) were selected to measure serum levels of endothelial adhesion molecules (AMs) (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin). ICAM-1 and E-selectin serum levels were higher in alcoholics, whereas VCAM-1 serum levels were similar in both groups. There was a significant correlation between daily alcohol intake and serum level of ICAM-1 ($r = 0.49$, $P = 0.003$) and E-selectin ($r = 0.41$, $P = 0.02$). A significant positive correlation between E-selectin and total lifetime dose of ethanol was also observed ($r = 0.52$, $P = 0.003$). These changes in serum levels of endothelial AMs of chronic alcoholics may reflect endothelial and/or immune activation.

INTRODUCTION

The endothelium is involved in several homeostatic mechanisms, such as the maintenance of a non-thrombotic surface, the metabolism of lipoproteins and in immune response (Ross, 1993). Several conditions may induce activation of endothelial cells, which leads to the appearance of adhesion molecules (AMs) on the cell surface. AMs, such as E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), mediate the attachment of certain leucocytes to the endothelial surface and may be important in controlling the extravasation of leucocytes from the circulation to sites of inflammation (Bevilacqua, 1993). Endothelial AMs may also be detected in a soluble form in the serum, usually reflecting higher expression on the cell membrane, and are increased

in inflammatory processes (septic shock, vasculitis, atherosclerosis) (Gearing and Newman, 1993).

Chronic alcohol intake has been shown to be associated with modulation of immune defence mechanisms (Watson *et al.*, 1994). In this sense, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of chronic alcoholics without liver disease are basally activated. This state is manifested by a higher expression of activation antigens, CD25, CD69, and HLA-DR (Sacanella *et al.*, 1998) and the AMs CD29, VLA proteins, CD11b, L-selectin, CD31, and CD57 (Cook *et al.*, 1995; Sacanella *et al.*, 1999) on PBMCs of alcoholic patients, compared to PBMCs of controls. However, whether the activation of immune cells in alcoholic patients without ethanol-related diseases is accompanied by endothelial cell activation manifested by raised serum levels of vascular AMs is unknown.

Thus, a study was carried out to analyse whether chronic alcohol consumption is related to the serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1. A group of 30 well-nourished chronic alcoholics without liver disease were compared with 30 subjects who did not drink any amount of ethanol (teetotallers).

*Author to whom correspondence should be addressed at: Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

PATIENTS AND METHODS

Patient and control selection

Over a 12-month period, a total of 420 patients with chronic alcoholism (DSM-III-R) (American Psychiatric Association, 1987) were seen in the Alcoholism Unit of our institution. This unit deals with ambulatory patients who seek assistance in terminating their dependence upon alcohol, but who do not suffer from other overt diseases. On the Monday of each week, the first male patient to register with a daily alcohol intake above 100 g in the previous 2 years up to the day prior to admission was selected for study. Initially, 40 patients were included. Among these patients, two had cirrhosis, four alcoholic hepatitis and fatty liver, and four had antibodies against hepatitis B or C virus, all were excluded from the study, leaving a total of 30 male alcoholics.

Control subjects were obtained from the medical and auxiliary personnel of our institution who reported not drinking any amount of ethanol (teetotalers). These subjects were matched for gender (male) and age (± 3 years) with the alcoholic patients and were studied in the same way as the alcoholics. All patients and controls were Caucasian males of Spanish descent. No patients or controls objected to being in the study, and all gave informed consent for the various procedures. The study protocol was approved by our Institutional Review Board.

Exclusion criteria

Alcoholic and control subjects were excluded from the study if they met one of the following criteria: human immunodeficiency virus infection or other causes of immunodeficiency, hepatitis B or C virus infection, cirrhosis, acute alcoholic hepatitis (AAH), malnutrition, neoplastic diseases, acute infectious diseases, consumption of drugs with effect on immunity (steroids, immunosuppressants), or chronic diseases such as diabetes mellitus.

Clinical, laboratory and nutritional studies

A detailed clinical history of ethanol intake, smoking, and dietary habits was obtained by two physicians (E.S. and J.F.-S.) using a structured questionnaire, and the data were confirmed by consultation with family members (Sobell *et al.*, 1979).

Within 24 h of admission to the hospital, blood samples were obtained to measure soluble endothelial AM and for laboratory studies. These

included red-cell and leucocyte count, liver-function tests, total protein, albumin, prealbumin, retinol-binding protein, and serum folate, vitamin B₁₂ and transketolase activity. The levels of ethanol in blood and urine, as well as serum antibodies against human immunodeficiency virus (ELISA) and hepatitis B and C viruses were determined in all patients.

Hepatic ultrasonography was performed in all patients and an echo-guided percutaneous needle liver biopsy was also performed in those patients with hepatomegaly, echographic evidence of chronic liver disease and/or aminotransferases greater than 120 U/l after 2 months of complete ethanol abstinence.

Overall nutrition was assessed in terms of the proportion of actual to ideal weight. The lean body mass was calculated from the circumference of the upper non-dominant arm and the thickness of the tricipital skin fold. Nutritional protein status was estimated according to the values obtained for lymphocyte count, haemoglobin, total protein, albumin, prealbumin, and retinol-binding protein. Caloric malnutrition was considered if the body weight was less than 90% of ideal weight and/or if lean body mass was more than 10% below the normal value. Protein malnutrition was considered if four of the six parameters mentioned above were below normal values (Nicolás *et al.*, 1993).

Quantification of soluble adhesion molecules

Serum levels of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin were determined by a sandwich ELISA technique. Commercially available kits from British Biotechnology Products, Abingdon, Oxon, UK for E-selectin and kits from Bender MedSystems, Vienna, Austria for ICAM-1 and VCAM-1 were used. The procedures were performed according to the manufacturers' instructions. Briefly, a horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin was added to microtitre plates coated with a murine monoclonal IgG antibody recognizing a different epitope of the corresponding molecule. After incubation with samples or standards in appropriate dilution, the colour reaction was developed with tetramethylenbenzidine, and the plates were read on an automated multiscanner at 450 nm. All measurements were performed in duplicate.

For ICAM-1 and VCAM-1, the intra-assay coefficients of variation were 4.1 and 3.1% respectively

(Bender MedSystems) and for E-selectin 4.8% (R&D Systems). The inter-assay coefficient of variation was 7.4% for E-selectin, 7.66% for ICAM-1, and 5.2% for VCAM-1.

Statistical analysis

The data were analysed using the SPSS-PC 4.0 statistical software (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences between groups were analysed using the two-tailed *t*-test, the χ^2 -test and Fisher's exact test. Non-parametric tests, such as the Mann-Whitney test, were performed when necessary. Correlation studies were obtained by Pearson's correlation coefficient and regression analysis. All variables are expressed as means \pm SD. Statistical significance was considered when the *P* value was below 0.05.

RESULTS

Clinical data, nutritional status, and lipid analysis

The alcoholic patients and the controls had a mean age (\pm SD) of 40.1 \pm 7.3 years and 37.3 \pm 6.1 years respectively. The daily ethanol intake of alcoholics was 196 \pm 54 g/day (range 110–383 g),

for a period of 18.5 \pm 11.4 years. The mean total lifetime dose of ethanol was 19.4 \pm 9.6 kg of ethanol/kg body wt. The pattern of drinking was continuous excessive ethanol intake as a part of everyday life. No differences were found in smoking habits and nutritional status between both groups (Table 1).

None of the alcoholics or the controls had clinical or laboratory evidence of caloric or protein malnutrition, although the mean circumference of the upper non-dominant arm and the thickness of the tricipital skin fold were lower in patients than in controls (*P* < 0.02, for both). Blood and urine levels of ethanol determined at the same time as the other laboratory analyses were negative in all alcoholics. In addition, serum levels of tryglycerides (132 \pm 64 vs 122 \pm 47 mg/dl, *P* = 0.4) and total cholesterol (225 \pm 12 vs 209 \pm 38 mg/dl, *P* = 0.1) were similar in alcoholics and controls.

Alcoholic liver disease (ALD)

Serum γ -glutamyl transpeptidase and alanine and aspartate aminotransferases were significantly higher in the alcoholics, compared to controls (*P* < 0.01) (Table 1). Hepatic ultrasonography was performed in all alcoholic cases and disclosed mild

Table 1. Clinical and nutritional data and liver-function tests of 30 chronic alcoholics without liver disease and their matched controls

Parameter	Alcoholics (<i>n</i> = 30)	Controls (<i>n</i> = 30)	Significance (<i>P</i>)
Age (years)	40.1 \pm 7.3	37.3 \pm 6.1	n.s.
Daily ethanol intake (g)	195.7 \pm 53.9	—	
Total life-time dose of ethanol (kg of ethanol/kg body wt)	19.4 \pm 9.6	—	
Smokers (<i>n</i>)	15	12	n.s.
Percentage of ideal weight (%)	113.8 \pm 25.6	105.6 \pm 12.6	n.s.
Lean body mass (kg)	52.7 \pm 7.4	54.4 \pm 5.7	n.s.
Lymphocyte count (cellsh/mm ³)	1943 \pm 458	2108 \pm 561	n.s.
Haemoglobin (g/l)	145.9 \pm 26	148.3 \pm 10.8	n.s.
Total protein (g/l)	72.7 \pm 7.1	71 \pm 5.1	n.s.
Albumin (g/l)	44.2 \pm 3.8	44.5 \pm 3	n.s.
Prealbumin (mg/dl)	32.1 \pm 9.4	30.7 \pm 4	n.s.
Retinol binding protein (mg/dl)	5.8 \pm 2.1	5.6 \pm 1.2	n.s.
Aspartate aminotransferase (IU/l)	49.7 \pm 32.3	24.1 \pm 9.5	<0.01
Alanine aminotransferase (IU/l)	51.8 \pm 31.7	34.8 \pm 18.4	<0.02
γ -Glutamyltranspeptidase (IU/l)	222.9 \pm 304	28.7 \pm 31.6	<0.01

n = number of cases; n.s. = not significant.

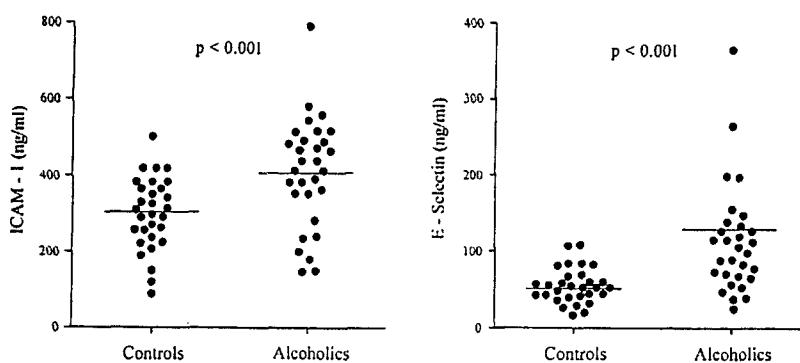


Fig. 1. Scatter plots indicating individual and mean (horizontal line) values of ICAM-1 and E-selectin serum levels in 30 chronic alcoholics and 30 controls.

hepatomegaly in five patients, and 11 other patients showed liver steatosis. In the remaining 20 patients, liver echography was entirely normal. Liver biopsy was performed in patients with hepatomegaly ($n = 5$) and in those with serum aminotransferases remaining greater than 120 U/l after 2 months of complete ethanol abstinence ($n = 2$). The liver biopsy performed in these seven patients showed fatty liver and alcoholic hepatitis in four, cirrhosis in two, but in one the biopsy was normal. The former six patients were excluded from the analysis. All the alcoholic patients were followed up over an average period of 18 months in the outpatient clinic and none exhibited clinical or laboratory evidence of liver disease.

Circulating adhesion molecules in alcoholic patients and controls

The mean serum levels of ICAM-1 (408.4 ± 134.2 vs 292.5 ± 92.4 ng/ml) and E-selectin (118.6 ± 74.7 vs 54.3 ± 22.5 ng/ml) were significantly

higher in alcoholics than in controls ($P < 0.001$), whereas the serum concentration of VCAM-1 was similar in both groups (Fig. 1 and Table 2). No differences were detected in serum levels of AMs among alcoholic patients with normal or abnormal liver function tests. In addition, alcoholic patients with normal liver function tests also had significantly higher serum levels of E-selectin and ICAM-1 than controls ($P < 0.01$, for both). Finally, serum levels of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 among smoker and non-smoker alcoholics and among alcoholics with normal and abnormal lipid analysis were similar (Table 2). Similar results were obtained in the control group.

Correlation between alcohol intake and serum concentrations of ICAM-1 and E-selectin

Alcoholics who reported a daily ethanol intake greater than 200 g/day showed a significantly higher serum level of ICAM-1 than their counterparts (489.2 ± 108.7 vs 350.7 ± 121.9 ng/ml, $P = 0.001$).

Table 2. Serum levels of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 in controls and alcoholics

Adhesion molecules	Controls ($n = 30$)	Alcoholics ($n = 30$)	Alcoholics, non-smokers ($n = 15$)	Alcoholics, smokers ($n = 15$)	Alcoholics with normal lipids ($n = 20$)	Alcoholics with abnormal lipids ($n = 10$)
ICAM-1	292.5 ± 92.4	$408.4 \pm 134.2^*$	400.7 ± 174.8	411.3 ± 119.1	402.6 ± 416.9	416.9 ± 80.8
E-Selectin	54.3 ± 22.5	$118.6 \pm 74.7^*$	122.8 ± 64.3	117.1 ± 79.2	113.5 ± 80.9	129.5 ± 68.3
VCAM-1	674.4 ± 382.7	663.9 ± 472	641.3 ± 329.8	672.6 ± 522.0	675.1 ± 586.2	672.4 ± 315.0

* $P < 0.001$ vs control patients.

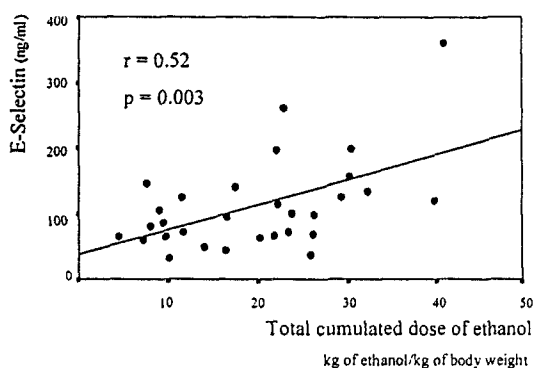


Fig. 2. Correlation between total cumulative dose of ethanol and serum level of E-selectin in a group of 30 chronic alcoholics without liver disease.

In addition, those patients with a total life-time dose of ethanol greater than 19 kg of ethanol/kg of body wt exhibited a significantly higher serum level of ICAM-1 (468.6 ± 127.3 vs 332 ± 122.3 ng/ml, $P < 0.01$) and E-selectin (137.5 ± 84.3 vs 84.9 ± 34.9 ng/ml, $P = 0.033$) than their counterparts. A significant positive correlation between ICAM-1 with daily ethanol intake was also observed ($r = 0.49$, $P = 0.003$), whereas the E-selectin serum level correlated with daily ethanol intake ($r = 0.41$, $P = 0.02$) and with the total life-time dose of ethanol ($r = 0.52$, $P < 0.01$) (Fig. 2). No correlation was found between VCAM-1 and ethanol intake.

DISCUSSION

Raised serum levels of vascular cell AMs (E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1) have been observed mainly in patients with infectious, inflammatory, and neoplastic diseases (Gearing and Newman, 1993). In addition, these molecules are considered as markers of atherosclerosis (Hwang *et al.*, 1997) and specifically of ischaemic heart disease (Ghaisas *et al.*, 1997). In these clinical settings, measuring serum levels of AMs may be useful to detect the subclinical activity and prognosis of these diseases.

In alcoholic patients, analysis of the serum levels of endothelial AMs has been focused on subjects with severe ALD. Patients with AAH or cirrhosis exhibited significantly higher serum

levels of these three AMs, compared to non-drinking controls (Adams *et al.*, 1994). Serum levels were higher in patients with AAH and in those actively drinking than in those with stable cirrhosis or abstainers (Shimada *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1994). Moreover, correlations between serum levels of vascular AMs and expression of these molecules on the hepatic endothelium (Adams *et al.*, 1994), degree of histologic injury (Ishii *et al.*, 1994; Douds *et al.*, 1997) or even clinical evolution of AAH (Shimada *et al.*, 1993) have been reported. Thus, some authors have suggested that the type of the inflammatory infiltrate (mononuclear or polynuclear cells) seen in the liver of ALD may depend, at least in part, on the nature of AM expressed on the hepatic endothelium (Adams, 1994; Adams *et al.*, 1994).

Studies in alcoholic patients without liver disease are scarce with the samples being too small ($n < 9$) and the results controversial. One of these studies did not include a control group (Adams *et al.*, 1994) and the other two only analysed ICAM-1 (Shimada *et al.*, 1993; Douds *et al.*, 1997). Moreover, the results of these studies were negative, since no significant differences were observed in endothelial AM serum levels. In the current study, significantly higher serum levels of E-selectin and ICAM-1 were observed in asymptomatic chronic alcoholics, suggesting endothelial and/or immune activation. Other confusing factors, such as smoking habit and hyperlipaemia, were also controlled. Moreover, the dose-dependent relationship between alcohol intake and serum levels of these AMs suggests a direct or indirect effect of ethanol on the endothelium. Raised levels of E-selectin always reflect endothelial activation due to its unique origin, whereas increased levels of ICAM-1 could reflect endothelial or immune activation (T-lymphocyte activation) (Gearing and Newman, 1993). In fact, the existence of activated T-cells in chronic alcoholics has already been described (Sacanella *et al.*, 1998). Increased E-selectin and ICAM-1 without changes in VCAM-1 serum levels has already been observed in patients with asthma (Montefort *et al.*, 1994) or ischaemic heart disease (Hwang *et al.*, 1997).

How alcohol exerts its effect on immune cells is unknown (Watson *et al.*, 1994), as is the mechanism by which ethanol may enhance the expression of AM on the endothelium. Proinflammatory

cytokines (IL-1, TNF- α) and endotoxin are potent stimulators of AM expression on endothelium (Bevilacqua, 1993). In ALD, the mechanism responsible for the different pattern of AM expression on the hepatic endothelium could be a change in local cytokine release (Adams, 1994; Adams *et al.*, 1994). A similar mechanism could act in alcoholic patients without ALD. In this sense, it is well established that alcoholic patients without ALD have raised serum levels of TNF- α and endotoxin compared to abstainers (Khoruts *et al.*, 1991).

Finally, the clinical significance of higher endothelial AM serum levels in chronic alcoholics remains to be elucidated. It may be useful in detecting patients developing ALD (quiescent phase) and also as an early marker of atherosclerosis. In the latter case, several studies have suggested that alcohol abusers have a significantly higher risk of undergoing ischaemic stroke or of death from cardiovascular disease, than abstainers, whereas moderate consumption of ethanol may have a beneficial effect on the cardiovascular system (Constant, 1997; Sacco *et al.*, 1999). It would be interesting to determine the serum levels of endothelial AMs in subjects who consume one to three drinks a day in order to establish whether they show significantly lower levels of these markers.

Acknowledgement — This work was supported in part by grant FIS 94/114.

REFERENCES

- Adams, D. H. (1994) Leucocyte adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol and Alcoholism* **29**, 249–260.
- Adams, D. H., Burra, P., Hubscher, S. G., Elias, E. and Newman, W. (1994) Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology* **19**, 588–594.
- American Psychiatric Association (1987) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3rd edn, revised. American Psychiatric Association Press, Washington, DC.
- Bevilacqua, M. P. (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual Reviews in Immunology* **11**, 767–804.
- Constant, J. (1997) Alcohol ischemic heart disease and the French paradox. *Coronary Artery Disease* **10**, 645–649.
- Cook, R., Ballas, Z. K., Waldschmidt, T. J., Vandersteen, D., LaBrecque, D. R. and Cook, B. L. (1995) Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **19**, 555–563.
- Douds, A. C., Lim, A. G., Jazrawi, R. P., Finlayson, C. and Maxwell, J. D. (1997) Serum intercellular adhesion molecule-1 in alcoholic liver disease and its relationship with histological disease severity. *Journal of Hepatology* **26**, 280–286.
- Gearing, A. J. H. and Newman, W. (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today* **14**, 56–512X?
- Ghaisas, N. K., Shahi, C. N., Foley, B., Goggins, M., Crean, P., Kelly, A., Kelleher, D. and Walsh, M. (1997) Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *American Journal of Cardiology* **80**, 617–619.
- Hwang, S. J., Ballantyne, C. M., Sharrett, A. R., Smith, L. C., Davis, C. E., Gotto, A. M. and Boerwinkle, E. (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC). *Circulation* **96**, 4219–4225.
- Ishii, K., Furedera, S., Kumashiro, R., Seo, J., Koga, Y., Sata, M. and Tanikawa, K. (1994) Role of serum interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in the severity of alcoholic hepatitis. *Alcohol and Alcoholism* **29** (Suppl. 1), 81–85.
- Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C., Logan, G. and Allen, J. I. (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* **13**, 267–276.
- Montefort, S., Lai, C. K., Kapahi, P., Leung, J., Chan, H. S., Haskard, D. O., Howarth, P. H. and Holgate S. T. (1994) Circulating adhesion molecules in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **149**, 1149–1152.
- Nicolás, J. M., Estruch, R., Antúnez, E., Sacanella, E. and Urbano-Márquez, A. (1993) Nutritional status in chronically alcoholic men from the middle socioeconomic class and its relation to ethanol intake. *Alcohol and Alcoholism* **28**, 551–558.
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801–809.
- Sacanella, E., Estruch, R., Gayà, A., Fernández-Solà, J., Antúnez, E. and Urbano-Márquez, A. (1998) Activated lymphocytes (CD25+ CD69+ cells) and decreased CD19+ cells in well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **22**, 897–901.
- Sacanella, E., Estruch, R., Gayà, A., Ferrer, K., Fernández-Solà, J., Alonso, J. R., Nicolás, J. M. and Urbano-Márquez A. (1999) Upregulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, in press.
- Sacco, R. L., Elkind, M., Boden-Albala, B., Lin, I-F., Kargman, D. E., Hauser, W. A., Shea, S. and Paik, M. C. (1999) The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *Journal of the American Medical Association* **281**, 53–60.

- Shimada, S., Yamauchi, M. and Toda, G. (1993) Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol and Alcoholism* **28** (Suppl. 1B), 47–51.
- Sobell, L. C., Maisto, S. A., Sobell, M. B. and Cooper, A. M. (1979) Reliability of alcohol abusers' self-reports of drinking behaviors. *Behaviour Research Therapy* **17**, 157–160.
- Watson, R. R., Borgs, P., Witte, M., McCuskey, R. S., Lantz, C., Johnson, M. I., Mufti, S. I. and Earnest, D. L. (1994) Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol and Alcoholism* **29**, 131–139.

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

IV DISCUSIÓN CONJUNTA

IV DISCUSIÓN CONJUNTA

Uno de los problemas fundamentales de los estudios que analizan el efecto del abuso crónico de alcohol en humanos es la selección de la población estudiada. Ya se ha comentado que la coexistencia de factores como hepatopatía alcohólica, malnutrición, enfermedades crónicas concomitantes, tabaquismo así como la inclusión de pacientes alcohólicos activos o con diferentes periodos de abstinencia puede alterar de forma notable los resultados de los estudios inmunológicos. Por este motivo para estos trabajos se seleccionaron de forma muy estricta una población de alcohólicos crónicos que había mantenido su ingesta de alcohol de forma constante hasta 24 horas antes de realizarse los estudios inmunológicos y en los que se habían descartado la presencia de malnutrición, hepatopatía alcohólica, infección por el virus de la hepatitis B y C y por el virus de la inmunodeficiencia humana y enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y de este modo poder analizar el efecto del abuso crónico de alcohol sobre la inmunidad sin la interferencia de otros factores de confusión. Se decidió realizar pruebas inmunológicas que afectaran a dos elementos clave en la respuesta inmune, las células endoteliales y los linfocitos, para determinar si el abuso crónico de etanol puede afectar a uno de ellos o a ambos.

En los trabajos que se presentan a continuación se incluyeron un grupo de alcohólicos crónicos y controles sanos no bebedores apareados por edad y sexo. El consumo de alcohol medio diario en los tres trabajos estaba por encima de 180 g/día durante un periodo aproximado de 20 años. Atendiendo a los criterios de exclusión se eliminaron los pacientes con hepatopatía o malnutrición mientras que el consumo de tabaco fue similar en ambos grupos. La selección exhaustiva de alcohólicos y controles

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

tuvo como objetivo conseguir que la única variable que diferenciara ambos grupos fuera el consumo de alcohol de los primeros.

En el **trabajo 1** se constata que el abuso crónico de alcohol en ausencia de hepatopatía y malnutrición se relaciona con cambios en las subpoblaciones linfocitarias e incremento de linfocitos activados de sangre periférica (LSP) que se objetiva por un aumento en la expresión de antígenos de activación y por la detección de concentraciones más elevadas del receptor soluble de interleukina 2 en estos pacientes.

En este trabajo se detectó un descenso significativo de la subpoblación CD19⁺ (linfocitos B) y un leve incremento de la CD3⁺ (linfocitos T) y de la CD45RO⁺ (células memoria) en los alcohólicos respecto a los controles ($p < 0,05$). El resto de subpoblaciones analizadas: células CD2⁺ (linfocitos T), CD4⁺ (linfocitos cooperadores), CD8⁺ (linfocitos citotóxicos), CD56⁺ (linfocitos NK), CD45RA⁺ (linfocitos vírgenes) y CD14⁺ (monocitos) fue similar en ambos grupos. Por otro lado, se observó un incremento de LSP activados que se manifiesta por la expresión de antígenos de activación (CD69, CD25, HLA DR) y por un incremento en los niveles séricos del receptor soluble de IL-2. Asimismo, se detectó una correlación positiva entre el consumo diario y acumulado de etanol y la presencia de LSP activados (CD25) mientras que la correlación es negativa con la expresión del receptor de transferrina (CD71). De este modo los LSP de los pacientes alcohólicos con consumo diario o acumulado de alcohol más elevado expresaban en mayor porcentaje CD25 y en menor CD71 ($p = 0,01$, ambos).

Tras la estimulación de los LSP con mitógenos los linfocitos en reposo entran en un ciclo de activación, diferenciación y proliferación celular durante el cual muchas

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

moléculas son expresadas en su membrana. Entre éstas tenemos los antígenos de activación (CD69, CD25, CD71, HLA DR y otros) que se expresarán en la membrana de una manera secuencial iniciándose la expresión de algunos de ellos a los pocos minutos, mientras que otros tardan hasta 2-3 semanas en aparecer. En nuestros pacientes alcohólicos la presencia de algunos antígenos de activación y no de otros sugiere que el proceso de activación linfocitario no se ha completado. Además, la ausencia del receptor de transferrina (CD71), que es un elemento fundamental para la proliferación linfocitaria, sugiere que la proliferación celular no es el objetivo de esta activación linfocitaria. Estos hallazgos son congruentes con el hecho conocido de que los LSP de alcohólicos no hepatópatas tienen una respuesta proliferativa más pobre tras ser estimulados con diversos mitógenos hecho que podría ser debido, al menos parcialmente, a una disregulación en la expresión de CD71 como se observa en los LSP de estos pacientes. Por último, se evaluó si el estado de activación linfocitaria que se había detectado se traducía en un incremento de producción de interleukinas inflamatorias como IL-6. Sin embargo, no se observan diferencias entre ambos grupos de pacientes. Esta situación viene a corroborar que el estado de activación linfocitaria de los LSP en los alcohólicos no es completo y que no condiciona ni un incremento en la síntesis basal de interleukina 6 ni en la proliferación linfocitaria.

En el **trabajo 2** se pone de manifiesto que los LSP de alcohólicos sin hepatopatía y bien nutridos presentan una hiperexpresión de moléculas de adhesión de la familia de las β_1 integrinas mientras quedan inalteradas la expresión de β_2 integrinas e ICAM-3.

Se constató un incremento de LSP que expresaban moléculas de adhesión (MA) pertenecientes a la familia de las β_1 integrinas (CD29, VLA-3, VLA-4, VLA-5) en el

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

grupo de alcohólicos respecto a los controles ($p < 0,03$). Sin embargo, el número de células que expresaban CD18 (β_2 integrina) o CD50 (ICAM-3) y la densidad de expresión de ambas moléculas era similar en los dos grupos. Analizando por separado la expresión de estas moléculas en diferentes subpoblaciones linfocitarias se observó que la hiperexpresión de MA de la familia de β_1 integrinas quedaba circunscrita a los linfocitos T (CD2⁺/CD8⁺), mientras que los linfocitos B (CD19⁺) y NK (CD56⁺) no presentaban diferencias entre ambos grupos. La expresión de CD18 y CD50 tampoco variaba en las diversas subpoblaciones analizadas.

Las MA leucocitarias juegan un papel crucial en la comunicación intercelular y permiten la migración de las células inmunes de la circulación a los tejidos a través de la interacción de estas MA con sus contrarreceptores endoteliales. Para estos estudios, se seleccionaron MA que median la adhesión a otras células (VLA-4, CD18, CD50) y a péptidos de la matriz extracelular (CD29, VLA-3, VLA-4, VLA-5) y cuya expresión en la membrana se modifica durante la activación linfocitaria. Se observó un incremento significativo de los LSP que expresan β_1 integrinas (CD29 y VLA) en los alcohólicos respecto a los controles y, mediante inmunofluorescencia doble, se identificó se trataba de linfocitos T. Estas MA que aparecen hiperexpresadas pertenecen a la familia de las β_1 integrinas y participan en fenómenos de adhesión intercelular y de adhesión a péptidos de la matriz extracelular lo que sugiere que los procesos de adhesión que se realizan a través de ellas pueden estar alterados en los alcohólicos crónicos.

Las células T “resting” expresan escasa-moderada cantidad de VLA-3, VLA-4 y VLA-5. Sin embargo, tras la activación del linfocito, se observa un incremento significativo en la expresión de estas moléculas. De igual manera cuando las células

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

vírgenes (CD45RA⁺) son estimuladas por antígenos específicos y se transforman en células memoria (CD45RO⁺) se incrementa de forma notable la expresión de MA y por lo tanto se modifica la capacidad de dichas células para interactuar con el entorno.

Caben varias teorías, no excluyentes entre sí, para explicar por qué se observa hiperexpresión de MA en LSP de alcohólicos. En primer lugar, podría tratarse de una manifestación fenotípica más del estado de activación basal de los LSP que presentan los alcohólicos. En segundo lugar, podría reflejar el incremento de células memoria (CD45RO⁺) que tienen los alcohólicos y que como ya se ha comentado expresan mayores cantidades de MA, ambas teorías serían concordantes con los hallazgos del trabajo 1. Una explicación alternativa podría ser que la hiperexpresión de MA tras el abuso crónico de etanol reflejara la existencia de un mecanismo compensador del efecto inhibitorio que ejerce la exposición aguda al etanol sobre diversos receptores de membrana como sucede con los receptores de NMDA en el sistema nervioso central o con la adhesión vía CD18 de LSP a astrocitos. Es significativo que no se modifique la expresión de CD50 y CD18 ni tampoco la expresión en linfocitos B y NK en los alcohólicos. Ello podría deberse a que no todas las células ni quizás todas las MA responden de una manera unívoca al mismo estímulo.

En el **trabajo 3** se pone en evidencia que el abuso crónico de alcohol induce cambios en el estado de activación del endotelio que se manifiesta por un incremento de la concentración de moléculas de adhesión endotelial solubles.

En el grupo de alcohólicos la concentración de ICAM-1 y de E-selectina fue más elevada que en los controles ($p < 0,001$), mientras que no se detectaron diferencias en la concentración de VCAM-1. La concentración sérica de las MA estudiadas fueron

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

similares cuando se compararon los alcohólicos con valores normales o anormales de transaminasas, alcohólicos con perfil lipídico normal o anormal y alcohólicos fumadores con no fumadores. Por último, cuando se compararon los alcohólicos con perfil hepático estrictamente normal y los controles la concentración de E-selectina e ICAM-1 seguía siendo mayor en los primeros ($p < 0,01$). Por otro lado, también se halló una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de MA endoteliales y la dosis diaria de alcohol (ICAM-1 y E-selectina) y también con la dosis acumulada de etanol (E-selectina).

Se ha señalado que la determinación de la concentración sérica de MA endotelial podría ser útil en enfermedades infecciosas, inflamatorias y neoplasias para detectar actividad subclínica de estas enfermedades y en ocasiones para evaluar el pronóstico. Más, recientemente se han utilizado como marcadores precoces de arterioesclerosis. En los pacientes alcohólicos se han analizado casi exclusivamente en pacientes con hepatopatía alcohólica y se observa un incremento sensible tanto en pacientes con cirrosis o hepatitis alcohólica. Son más elevadas las concentraciones en sujetos con hepatitis y bebedores activos que en aquellos ex-enólicos o con cirrosis compensada. En alcohólicos no hepatópatas los estudios son escasos con muestras muy reducidas, sin grupo control y sin obtenerse diferencias significativas.

El incremento significativo en la concentración sérica de E-selectina e ICAM-1 sugiere una situación de activación endotelial y/o inmunológica en los alcohólicos. Así, la expresión exclusiva de E-selectina en el endotelio activado confirma la existencia de activación endotelial mientras que la elevación de ICAM-1, debido a su origen, puede ser reflejo de activación endotelial y/o linfocitaria. La eliminación de otros factores de

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

confusión (hiperlipemia, tabaquismo y hepatopatía) que pueden alterar las concentraciones de esas MA junto a la relación dosis dependiente entre el alcohol y los niveles séricos de E-selectina e ICAM-1 sugiere fuertemente que el abuso crónico de alcohol ejerce un efecto directo o indirecto sobre el estado basal del endotelio y lo mantiene activado. El aumento en las concentraciones séricas de MA endotelial pueden alterar las interacciones entre células inmunes y endotelio y por lo tanto alterar la respuesta inmune en los alcohólicos. La utilidad clínica de estas determinaciones no está bien establecido, sin embargo emergen, dos posibilidades: por una lado para detectar alcohólicos en una fase incipiente de hepatopatía alcohólica (fase quiescente) y también como marcadores precoces de arterioesclerosis. En este sentido, diversos estudios han sugerido que los alcohólicos crónicos tienen un riesgo mayor de sufrir un accidente vascular isquémico o de morir de un evento cardiovascular, mientras que el consumo moderado de etanol puede ejercer un efecto protector sobre el sistema cardiovascular.

Se desconoce a través de que mecanismo ejerce su efecto el alcohol sobre las células en general y sobre las células inmunes en particular. Ya se ha comentado al principio que se postulan diferentes teorías al respecto que incluyen: un efecto directo del etanol o sus metabolitos sobre las membranas celulares, alteración de los mecanismos de transducción de señales intracelulares, modificación del microentorno de citokinas e incluso a través de alterar el eje neuroendocrino. Actualmente no existe una única hipótesis que sirva para explicar de forma global el efecto del alcohol sobre el sistema inmune, sin embargo, existen ejemplos puntuales que apoyan una u otra teoría sobre como actúa el alcohol en el sistema inmune tal como ya hemos referido.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

De los trabajos presentados se deriva que el abuso crónico de alcohol en ausencia de otras enfermedades se asocia con cambios en diversos parámetros inmunológicos que afectan tanto a los linfocitos como a las células endoteliales y todo ello puede afectar a la respuesta inmune de los pacientes alcohólicos crónicos frente a agentes externos e incluso frente a estructuras internas modificadas por los “adducts”. El hecho de que no todos los alcohólicos con similares ingesta de etanol tengan de forma constante anomalías en los parámetros inmunológicos sugiere que puede existir cierta susceptibilidad individual para padecer estas anomalías como puede suceder en otras complicaciones derivadas del alcoholismo crónico.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

V CONCLUSIONES

V CONCLUSIONES

1. Conclusiones generales

1. Los alcohólicos crónicos bien nutridos y sin hepatopatía asociada presentan diversas alteraciones en los parámetros inmunológicos analizados: subpoblaciones linfocitarias, expresión de moléculas de adhesión y concentraciones séricas de moléculas de adhesión solubles.

2. La ausencia de otros factores conocidos potencialmente inductores de estos cambios sugiere que el consumo crónico de alcohol es el responsable de los mismos a través de un mecanismo de acción no conocido.

3. No todos los alcohólicos con similar consumo de etanol presentan anomalías equivalentes en los parámetros inmunológicos analizados. Ello sugiere que puede existir una cierta sensibilidad individual a padecer estas anomalías en el sistema inmunitario en los alcohólicos de manera similar a como sucede con otras enfermedades asociadas al alcoholismo crónico.

2. Conclusiones por trabajos

1. Los pacientes alcohólicos crónicos bien nutridos y sin hepatopatía asociada presentan una mayor porcentaje de linfocitos activados, preferentemente linfocitos T. Esta situación se manifiesta por un incremento en la concentración sérica del receptor

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

soluble de interleukina 2 y por aumento en la expresión de antígenos como CD69 (antigen inducer molecule), CD25 (receptor de interleukina-2), HLA-DR (antígenos de histocompatibilidad de clase II). Sin embargo, la expresión de CD71 (receptor de transferrina) que es básico para la proliferación linfocitaria se mantiene inalterado respecto a los controles. Por eso se considera que la activación linfocitaria es incompleta. (trabajo 1).

2. Se observa un descenso significativo de la subpoblación CD19⁺ (linfocitos B) en alcohólicos respecto a los controles ($p < 0.001$) y un leve incremento de los linfocitos T (CD3⁺) y de los linfocitos memoria (CD45RO⁺) ($p < 0.05$). No hay diferencias en el resto de poblaciones analizadas: linfocitos NK (CD56⁺) y monocitos (CD14⁺), linfocitos T cooperadores (CD4⁺) y citotóxicos (CD8⁺). (trabajo 1)

3. Se han hallado correlaciones significativas entre el consumo de etanol y diferentes parámetros inmunológicos analizados. Así, el porcentaje de células CD25⁺ se correlaciona con la dosis diaria de alcohol ($r = 0.56$, $p < 0,001$) y con la dosis total acumulada de etanol ($r = 0,48$, $p < 0,01$). Mientras que la dosis total acumulada de etanol se correlaciona positivamente con el porcentaje de linfocitos T que expresan HLA-DR ($r = 0,42$, $p < 0,04$) y negativamente con el porcentaje de linfocitos que expresan CD71 ($r = - 0,39$, $p < 0,04$). No existe correlación entre la población CD19⁺ y el consumo de alcohol. (trabajo 1)

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

4. Los linfocitos totales de alcohólicos crónicos presentan hiperexpresión de moléculas de adhesión de la familia de las β_1 integrinas (CD29, VLA-3, VLA-4 y VLA-5) respecto a los controles no bebedores ($p < 0.05$) mientras que no existen diferencias entre ambos grupos en la expresión de moléculas de adhesión de la familia de las β_2 integrinas (CD18) y de Intercellular adhesion molecule-3 (CD50). (trabajo 2)

5. La hiperexpresión de moléculas de adhesión de las β_1 integrinas observadas en los linfocitos de los alcohólicos afecta únicamente a los linfocitos T ($CD2^+/CD8^+$) dejando inalterados linfocitos B ($CD19^+$) y linfocitos NK ($CD56^+$). No se detectan diferencias en la expresión de CD18 (β_2 integrina) y en CD50 entre ambos grupos. Los cambios observados sugieren un estado de activación persistente de los linfocitos T de los alcohólicos y podrían traducir anomalías en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. (trabajo 2).

6. En el suero de alcohólicos crónicos existen concentraciones más elevadas de determinadas moléculas de adhesión endotelial (E-selectina, ICAM-1) que en controles no bebedores ($p < 0,001$). Ello sugiere que existe un estado de activación endotelial y/o linfocitaria basal en los alcohólicos crónicos y que pueden estar alterados las interacciones entre leucocitos y endotelio en estos pacientes. (trabajo 3)

7. Existe una correlación positiva entre E-selectina y dosis diaria de alcohol ($r = 0,41$, $p = 0,02$) y E-selectina y dosis total acumulada de etanol ($r = 0,52$, $p < 0,01$). Asimismo hay una correlación positiva entre ICAM-1 y dosis diaria de alcohol ($r = 0,49$, $p =$

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

0,003). Este hallazgo conjuntamente con el hecho de que otros factores con efecto sobre el endotelio (perfil lipídico y tabaquismo) eran similares en alcohólicos y controles sugiere que existe una relación directa entre abuso crónico de etanol e hiperexpresión de moléculas endoteliales in vivo aunque no podemos describir el mecanismo patogénico responsable. (trabajo 3)

**EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE
ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

VI BIBLIOGRAFÍA

VI BIBLIOGRAFÍA

1. A, Urbano-Márquez, R Estruch, F Navarro López, JM Grau, L Mont, E Rubin. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Eng J Med* 320:409-415, 1989.
2. J Villalta, R Estruch, E Antúnez, J Valls, A Urbano-Márquez. Vagal neuropathy in chronic alcoholics: relation to ethanol consumption. *Alcohol Alcoholism* 24:421-428, 1989.
3. JM Nicolás, R Estruch, M Salamero, N Orteu, J Fernández-Solá, E Sacanella, A Urbano-Márquez. Brain impairment in chronic alcoholics is related to ethanol intake. *Ann Neurol* 41:590-598, 1997.
4. R Estruch, J Fernández-Solá, E Sacanella, C Paré, E Rubin, A Urbano-Márquez. Relationship between cardiomyopathy and liver disease in chronic alcoholism. *Hepatology* 22:532-538, 1995.
5. Adams HG, Jordan C. Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am* 68:179-202, 1984.
6. SI Mufti, HR Darban, RR Watson: Alcohol Cancer and Immunomodulation. *Crit Rev Oncol Hematol* 9:243-261, 1989.
7. J Fernández-Solá, A Junqué, R Estruch, R Monforte, A Torres, A Urbano-Márquez: High alcohol intake as a risk prognostic factor for community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 155:1649-1654, 1995.
8. RR Watson, P Borgs, M Witte, RS McCuskey, C Lantz, MI Johnson, SI Mufti, DL Earnest: Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol Alcohol* 29:131-139, 1994.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

9. RT Cook. Alcohol abuse, alcoholism and damage to the immune system. A review. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1927-1942, 1998.
10. RR MacGregor. Alcohol and immune defense. *JAMA* 256:1471-1479, 1986.
11. F Paronetto. Immunologic reactions in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13:183-195, 1993.
12. DH Adams. Leucocyte adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol* 29:249-260, 1994.
13. N Fisher, S Afford, DH Adams. Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepato-gastroenterology* 43:1113-1116, 1996.
14. DH Adams, P Burra, SG Hubscher, E Elias, W Newman. Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology* 19:588-594, 1994.
15. A Chedid, CL Mendenhall, TE Moritz, SW French, TS Chen, TR Morgan, and the VA Cooperative Study group 275. Expression of the β_1 chain (CD29) of integrins and CD45 in alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 88:1920-1927, 1993.
16. WG Wood, C Gorka, F Schroeder. Acute and chronic effects of ethanol on transbilayer membrane domains. *J Neurochem* 52:925-930, 1989.
17. K Doyle, J Hojnacki, J Cluette-Brown. Ethanol-induced alterations in erythrocyte membrane phospholipid composition. *Am J Med Sci* 299:98-102, 1990.
18. CD Stubbs, BW Williams, CL Pryor, E Rubin. Ethanol-induced modifications to membrane lipid structure: effect on phospholipase A2-membrane interactions. *Arch Biochem Biophys* 262:560-573, 1988.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

19. S Hrelia, L Biagi, A Bordoni, M Celadon, CA Rossi, E Castelli, FG Foschi, G Gasbarrini, GF Stefanini. In vivo effects of chronic ethanol consumption on the fatty acid composition of phosphatidylinositols in resting and anti-CD3 activated lymphocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 17:1044-1050, 1993.
20. F Spinozzi, E Agea, G Bassotti, S Belia, F Rondoni, L Broccucci, A Solinas, R Gerli, A Bertotto. Ethanol-Specific impairment of T-lymphocyte activation is caused by a transitory block in signal transduction pathways. *Gastroenterology* 105:1490-1501, 1993.
21. F Chiappelli, M Kung, P Lee, L Pham, E Manfrini, P Villanueva: Alcohol modulation of human normal T-cell activation, maturation and migration. *Alcohol Clin Exp Res* 19:539-544, 1995.
22. I Diamond, B Wrubel, W Estrin, A Gordon. Basal and adenosine receptor-stimulated levels of cAMP are reduced in lymphocytes from alcoholic patients. *Proc Natl Acad Sci* 84:1413-1416, 1987.
23. L Nagy, I Diamond, A Gordon. Cultured lymphocytes from alcoholic subjects have altered cAMP signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* 85:6973-6976, 1988.
24. GA Roselle, CL Mendenhall, A Chedid, TE Moritz, P Gartside, and the Veterans Affairs Cooperative Study Groups 119 and 275. 1. Alcohol modulation of immune function:clinical and experimental data. *Alcohol Clin Exp Res* 19:551-554, 1995.
25. C Brodie, J Domenico, EW Gelfand. Ethanol inhibits early events in T-lymphocyte activation. *Clin Immunol Immunopathol* 70:129-136, 1994.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

26. C Brodie, J Domenico, BD Mazer, EW Gelfand. Ethanol inhibits ligand-activated Ca^{2+} channels in human B lymphocytes. *J Cell Physiol* 152:441-447, 1992.
27. GF Stefanini, E Castelli, FG Foschi, S Hrelia, PL Biagi, M Celadon, A Bordoni, G Gasbarrini. Alcoholic's impaired lymphocyte response is caused by alcohol. *Gastroenterology* 106:1724-1726, 1994.
28. F Spinozzi, A Bertotto, F Rondoni, R Gerli, F Scalise F Grignani. T-lymphocyte a activation pathways in alcoholic liver disease. *Immunology* 73:140-146, 1991.
29. J. Deviere, C. Denys, L. Schandene, F. Romasco, M. Adler, J. Wybran, E. Dupont: Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 72:377-382, 1988.
30. MG Mutchnick, HH Lee: Impaired lymphocyte proliferative response to mitogen in alcoholic patients. Absence of a relation to liver disease activity. *Alcohol Clin Exp Res* 12:155-158, 1988.
31. S Zakhari, S Ghosh, G Szabo, R Medford, AM Diehl. NF- κ B prototypical cytokine regulated transcription factor:implications for alcohol mediated responses. *Alcohol Clin Exp Res* 20:236A-242A, 1996.
32. P Mandrekar, D Catalano, G Szabo. Alcohol induced regulation of nuclear regulatory factor κ B in human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 21:988-994, 1997.
33. CS Lieber. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 257:59-84, 1997.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

34. G Thiele, DJ Tuma, MS Willis, JA Miller, TL McDonald, MF Sorrell, LW Klassen. Soluble proteins modified with acetaldehyde and malondialdehyde are immunogenic in the absence of adjuvant. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1731-1739, 1998.
35. Y Israel, H Orrego, O Niemela. Immune responses to alcohol metabolites: pathogenic and diagnostic implications. *Semin Liver Dis* 8:81-90, 1988.
36. LW Klassen, GM Thiele. Immune reactivity to proteins biotransformed by alcohol metabolites. *Alcohol Clin Exp Res* 22:204S-207S, 1998.
37. AP Bautista. The role of Kupffer cells and reactive oxygen species in hepatic injury during acute and chronic ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 22:255S-259S, 1998.
38. AP Bautista. Chronic alcohol intoxication attenuates human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 induced superoxide anion release by isolated kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* 22:474-480, 1998.
39. R Estruch: Alcohol and nutrition in TJ Peters (ed): *Alcohol misuse. A European perspective*. London UK, Harwood Academic Publishers, 1996, pp 41-61.
40. JM Nicolás, R Estruch, E Antúnez, E Sacanella, A Urbano-Márquez. Nutritional status in chronically alcoholic men from the middle socioeconomic class and its relation to ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 28:551-558, 1993.
41. B Watzl, RR Watson. Role of nutrients in alcohol induced immunomodulation. *Alcohol Alcohol* 28:89-95, 1993.
42. NS Scrinshaw, JP SanGiovanni. Synergism of nutrition, infection and immunity:an overview. *Am J Clin Nutr* 66:464S-477S, 1997.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

43. SJ Ewald, H Shao. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 17:359-363, 1993.
44. LL Slukvin, TR Jerrells. Different pathways of in vitro ethanol-induced apoptosis in thymocytes and splenic T and B lymphocytes. *Immunopharmacol* 31:43-57, 1995.
45. RR Watson, JC Jackson, B. Hartmann, R. Sampliner, D. Mobley, C. Eskelson. Cellular immune functions, endorphins and alcohol consumption in males. *Alcohol Clin Exp Res* 9: 248-254, 1985.
46. F Li, RT Cook, C Alber, W Rasmussen JT Stapleton, ZK Ballas. Ethanol and natural killer cells. II. Stimulation of human natural killer activity by ethanol in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 21:981-987, 1997.
47. RT Cook, F Li, D Vandersteen, ZK Ballas, BL Cook, DR LaBrecque. Ethanol and natural killer cells. I. Activity and immunophenotype in alcoholic humans. *Alcohol Clin Exp Res* 21:974-980, 1997.
48. FJ Laso, JI Madruga, JA Girón, A López, J Ciudad, JF San Miguel, M Alvarez-Mon, A Orfao. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 25: 1096-1100, 1997.
49. S Ben-Elihayu, GG Page, R Yirmiya, AN Taylor. Acute ethanol intoxication supresses natural killer cell activity and promotes tumor metastasis. *Nature* 2:456-460, 1996.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

50. PW Jareo, LC Preheim, PD Lister, MJ Gentry. The effect of ethanol ingestion on killing of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by rat neutrophils. *Alcohol* 30:311-318, 1995.
51. AP Bautista. Chronic alcohol intoxication enhances the expression of CD18 adhesion molecules on rat neutrophils and release of a chemotactic factor by kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* 19:285-290, 1995.
52. G Szabo. Monocytes, alcohol abuse and altered immunity. *Alcohol Clin Exp Res* 22:216S-219S, 1998.
53. L Girouard, P Mandrekar, D Catalano, G Szabo. Regulation of monocyte interleukin-12 production by acute alcohol: a role for inhibition by interleukin-10. *Alcohol Clin Exp Res* 22:211-216, 1998.
54. AP Bautista. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 25:335-342, 1997.
55. TR Jerrells, D Sibley. Effects of ethanol on cellular immunity to facultative intracellular bacteria. *Alcohol Clin Exp Res* 19:11-16, 1995.
56. C Waltenbaugh, K Vasquez, JD Peterson. Alcohol consumption alters antigen specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin Exp Res* 22:220S-223S, 1998.
57. H Friedman. Alcohol effects on cytokine responses by immunocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 22:184S-187S, 1998.
58. F. Martinez, ER Abril, DL. Earnest, RR. Watson. Ethanol and Cytokine secretion. *Alcohol* 9: 455-458, 1992.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

59. Nelson S, Mason C, Bagby G, Summer W: Alcohol, tumor necrosis factor and tuberculosis. *Alcohol Clin Exp Res* 19:17-24, 1995.
60. F Martinez, N Thomas, H Darban, T Cox, S Wood, RR Watson: Interleukin-6 and interleukin-8 production by mononuclear cells of chronic alcoholics during treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 17:1193-1197, 1993.
61. C McClain, D Hill, J Schmidt, AM Diehl. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13:170-182, 1993.
62. J. Deviere, J. Content, C. Denys, P Vandenbussche, L Schandene, J Wyrbran, E Dupont. High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol* 77:221-225, 1989.
63. F Spinozzi, E Cimignoli, R Gerli, E Agea, A Bertotto, F Rondoni, F Grignani. IgG subclass deficiency and sinopulmonary bacterial infections in patients with alcoholic liver disease. *Arch Intern Med* 152:99-104, 1992.
64. GJ Bagby, DA Stoltz, P Zhang, RP Bohm, S Nelson. Simian immunodeficiency virus, infection, alcohol and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 22:193S-195S, 1998.
65. U Ringborg. Alcohol and the risk of cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 22:323S-328S, 1998
66. AJ Garro, CS Lieber. Alcohol and Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:219-249, 1990.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

67. K Ishii, S Furedera, R Kumashiro, et al. Tanikawa: Role of serum interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in the severity of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol* 29:81-85, 1994.
68. A. Khoruts, L. Stahnke, C. McClain et al. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13:267-276, 1991.
69. F. Mili, D. Flanders, J. Boring et al. The associations of alcohol drinking and drinking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 688-694, 1992.
70. RT Cook, TJ Waldschmidt, BL Cook et al.. Loss of the CD5⁺ and CD45RA^{hi} B cell subsets in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 103:304-310, 1996.
71. R Cook, ZK Ballas, TJ Waldschmidt et al. Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:555-563, 1995.
72. Z. Kronfol, M. Nair, E. Hill et al. Immune functions in alcoholism: a controlled study. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 279-283, 1993.
73. RT Cook, MJ Garvey, BM Booth et al. Activated CD8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol* 11: 246-253, 1991.
74. RT Cook, TJ Waldschmidt, ZK Ballas, et al.. Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leucocyte common antigen and β -integrin. *Alcohol Clin Exp Res* 18:71-80, 1994.

EL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

75. MA Kolber RM Walls, ML Hinnens, DS Singer. Evidence of increased class I MHC expression on human peripheral blood lymphocytes during acute ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 12:820-823, 1988.