





Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **Alteraciones de los linfocitos T en pacientes con trastorno por uso de alcohol**

**Yenny Paola Zuluaga Blanco**

Tesis Doctoral

**Directores: Roberto Muga Bustamante**  
**Jordi Tor Aguilera**

**Tutor: Roberto Muga Bustamante**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

2018



Universitat Autònoma de Barcelona

## **Tesis Doctoral**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

# **Alteraciones de los linfocitos T en pacientes con trastorno por uso de alcohol**

Tesis presentada por Yenny Paola Zuluaga Blanco para  
optar al grado de Doctor

Roberto Muga Bustamante  
Director de Tesis

Jordi Tor Aguilera  
Director de Tesis

Yenny Paola Zuluaga Blanco  
Doctoranda

Roberto Muga Bustamante  
Tutor de Tesis

2018

## ABREVIACIONES

ADH: alcohol deshidrogenasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: célula presentadora de antígeno

DE: desviación estándar

DN: dobles negativos (linfocitos)

DP: dobles positivos (linfocitos)

IA: índice de activación

IC: intervalo de confianza

ICAM: moléculas de adhesión celular de las inmunoglobulinas (*Immunoglobulin Cell-Adhesion Molecules*)

Ig : inmunoglobulinas

IL: interleuquina

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

LB: linfocito B

LPS: lipopolisacárido

LT: linfocitos T

LT<sub>MC</sub>: linfocitos T de memoria central

LT<sub>ME</sub>: linfocitos T de memoria efectora

MEOS: sistema oxidativo microsomal (*Microsomal Ethanol-Oxidizing System*) (MEOS)

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NK: *Natural Killer*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: odds ratio

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PCR: proteína C reactiva

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*)

RCT: receptor de células T

RIQ: rango intercuartil

RLO: radicales libres de oxígeno

RVD: receptor de vitamina D

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

Tc: T citotóxicos (linfocitos)

Th: T *helper* (linfocitos)

Tr: T reguladores (linfocitos)

TLR: receptores tipo Toll (*Toll-Like Receptors*)

TNF: factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

TUA: trastorno por uso de alcohol

VEB: virus Epstein Barr

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

# Índice

	Página
<b>Agradecimientos</b>	9
<b>Resumen</b>	11
<b>Summary</b>	12
<b>Introducción</b>	13
1 Trastorno por uso de alcohol	14
1.1 Complicaciones asociadas	15
2 Generalidades del sistema inmunológico	18
2.1 Inmunidad innata	18
2.2 Inmunidad adquirida	19
2.2.1 Subpoblaciones CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	21
2.2.2 Linfocitos DN y DP	23
2.2.3 Activación de los LT	25
2.2.4 Diferenciación y supervivencia de los LT	26
3 Efectos del alcohol en el sistema inmunológico	28
3.1 Efectos del alcohol en la inmunidad innata	29
3.2 Efectos del alcohol en la inmunidad adquirida	31
3.2.1 Activación de los LT	33
3.2.2 Diferenciación de los LT	34
3.2.3 Apoptosis de los LT	36
<b>Hipótesis</b>	38
<b>Objetivos</b>	40
<b>Pacientes y métodos</b>	42
<b>Resultados</b>	47
<b>Discusión</b>	64
<b>Conclusiones</b>	72
<b>Líneas de futuro que se desprenden de la investigación</b>	74
<b>Anexo 1. Publicaciones relacionadas con la introducción</b>	77
<b>Anexo 2. Fuentes de financiación</b>	109
<b>Referencias</b>	110

*El tiempo discurre como el río: no vuelve.*

Proverbio popular chino

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es el primer paso de mi carrera como investigadora clínica, llevada a cabo en el servicio de Medicina Interna y la Unidad de Adicciones del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

He tenido el privilegio y la oportunidad de trabajar en el equipo del Dr. Muga y en el laboratorio de Inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol, en un tema nuevo para el grupo: la utilidad de la citometría de flujo en el paciente con trastorno por uso de alcohol.

Mi especial agradecimiento al Dr. Muga, director y tutor de esta Tesis y persona influyente en mi carrera profesional. Le agradezco la oportunidad de aprender el oficio de la investigación. Su apoyo, confianza, dedicación y visión me ha marcado un camino firme hacia la obtención del doctorado y han moldeado mi formación como internista. Su espíritu inquietante y soñador me ha inspirado a nuevos retos en mi carrera profesional.

A Arantza Sanvisens. Es un privilegio trabajar con ella. Su capacidad de llevar a hechos concretos las propuestas que empiezan como simples ideas ha hecho posible esta Tesis. Agradezco la competencia que tiene en abarcar e integrar distintos aspectos de la investigación clínica y transformarlos en resultados y conclusiones. Su soporte y comprensión me han ayudado a soportar tiempos difíciles.

Al Dr. Tor, codirector de esta Tesis y jefe del Servicio de Medicina Interna durante el tiempo que estuve trabajando en la Tesis. Agradezco la confianza y apoyo durante estos años. Su convicción en formar internistas capaces de asistir, investigar y enseñar, me han motivado a ampliar mis retos profesionales.

A la confianza, experiencia y disposición de la Dra. Eva Martínez-Cáceres y Dra. Aina Teniente, del departamento de Inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol y coautoras de los artículos. Eva, por su interés de mejorar mi formación como investigadora, en especial en citometría de flujo, y por su colaboración científica. A



Aina, por el análisis e interpretación del inmunofenotipado y su disposición en atender cualquier pregunta. Agradezco a Marco Fernández, Amanda Rus y Camila Piatti de la Unidad de Citometría del Instituto Germans Trias i Pujol su ayuda y asistencia técnica. A mis compañeros del grupo de trabajo y en especial los coautores de los trabajos en los que he participado. Ha sido muy grato para mí, compartir y reír con ellos y aprender también de Daniel Fuster e Inma Rivas. A mis compañeros y amigos del hospital con quienes comparto la asistencia en hospitalización y urgencias y que con su interés motivan mis preguntas.

Finalmente, al mejor proyecto de mi vida; Mariana. A Andrés por su amor, soporte y constante esfuerzo. A mis padres, les agradezco lo que soy y lo que seguiré siendo.

## RESUMEN

El Trastorno por Uso de Alcohol (TUA) es una enfermedad que puede cursar con múltiples complicaciones. El sistema inmunológico se ve comprometido por el abuso de alcohol, hecho que predispone al desarrollo de múltiples enfermedades, entre las que destacan las infecciosas. En la inmunidad adquirida, el consumo crónico de alcohol se ha visto relacionado con alteraciones en el número, función y fenotipo de los linfocitos B y T. El objetivo principal de esta Tesis doctoral es caracterizar las alteraciones del linfocito T, célula clave de la inmunidad adquirida, en pacientes con TUA. Los resultados obtenidos se pueden ver reflejados en dos artículos científicos publicados en la revista *Drug and Alcohol Dependence*.

En el primer artículo, se analizan las alteraciones de las principales subpoblaciones linfocitarias T en una serie de pacientes admitidos a tratamiento del TUA entre 2002 y 2012. En concreto, se analizan linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Dobles Positivos (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) y Dobles Negativos (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>). Los resultados ponen de manifiesto que las alteraciones linfocitarias cuantitativas son frecuentes en este tipo de pacientes, aparentemente asintomáticos, que vienen a tratarse del TUA. De hecho, una cuarta parte presentan niveles elevados de linfocitos CD8<sup>+</sup>, un 50% muestran bajo número de células Doble Negativas y un 13% presentan linfopenia de linfocitos CD4<sup>+</sup>, con lo que ello implica en el riesgo de sufrir infecciones oportunistas. El manuscrito plantea la relevancia del análisis de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TUA para identificar aquéllos con mayor riesgo de infecciones.

El segundo artículo se centra en analizar indicadores de activación del LT, comparando su expresión en dichos pacientes y en controles sanos. Mediante citometría de flujo se utiliza una combinación de marcadores linfocitarios de superficie (CD38 y HLA-DR). Los resultados ponen de manifiesto que pacientes con TUA tienen un exceso de activación de linfocitos CD8<sup>+</sup> y que el exceso de activación está inversamente relacionado con el número absoluto de linfocitos CD4<sup>+</sup>.

## **SUMMARY**

Alcohol Use Disorder (AUD) is a disease with multiple associated complications. The immune system can be compromised by alcohol abuse and alterations of the innate and adaptive immunity may predispose to the development of infections. Related to the acquired immunity, chronic alcohol consumption has been associated with alterations in the number, function and phenotype of B and T lymphocytes.

The aim of this Thesis is to better characterize the alterations of T lymphocyte subsets in patients with AUD. The results obtained in this research have been published as original articles in the journal Drug and Alcohol Dependence.

In the first article, we aimed to analyze the prevalence and factors associated with quantitative alterations of T lymphocytes subpopulations in 238 patients admitted to treatment of AUD between 2002 and 2012. Specifically, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Double Positive (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) and Double Negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) lymphocytes are analyzed in this case series. The results show that quantitative T-cell alterations are frequent and, in fact, 25% of patients have increased numbers of CD8<sup>+</sup>, 50% have low Double Negative cells and 13% have decreased number of CD4<sup>+</sup> cells. Therefore, the article discuss the importance of including the analysis of the T-cell subpopulations in individuals with chronic AUD to better identify those at high risk of infections.

The second article focuses on markers of LT activation when comparing their expression in AUD patients and healthy controls. We used a combination of cell surface markers (CD38 and HLA-DR). Results show that patients with AUD have an excess of CD8<sup>+</sup> T-cell activation compared to healthy controls and that the excess of activation is inversely correlated with the absolute number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### 1. Trastorno por uso de alcohol

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en su última versión publicada en 2013 (DSM-5), el Trastorno por Uso de Alcohol (TUA) se define como una enfermedad primaria, crónica y neurobiológica con factores genéticos, psicosociales y ambientales que influyen en sus manifestaciones; el TUA se caracteriza por conductas como la pérdida de control sobre el consumo y un uso compulsivo o continuado a pesar de los efectos nocivos sobre la salud y la esfera social del paciente (1). Actualmente, es la enfermedad mental más común y menos tratada en países desarrollados (2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que 76 millones de personas en el mundo tienen abuso o dependencia del alcohol (3). El inicio temprano en el consumo, además de un consumo de riesgo durante la adolescencia y el antecedente familiar de dependencia al alcohol son los principales factores que pueden influir en su desarrollo (4). En Estados Unidos, el 10% de la población cumple criterios de TUA y el 23% presentan un consumo de riesgo (5). A nivel europeo, los resultados de un estudio epidemiológico de enfermedades mentales (*ESEMeD-European Study of the Epidemiology of Mental Disorders*) muestra que un 9% de los hombres y un 1.4% de las mujeres cumplen criterios de TUA (6). En España, según la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas 2009-2010, el 4.4% de la población general entre 15 y 64 años presenta un consumo de alcohol de riesgo (7).

Una revisión sistemática reciente del TUA indica que el primer episodio de tratamiento es tardío y se produce cuando el trastorno está clínicamente establecido (2). De hecho, la cohorte de pacientes con TUA de la Red de Trastornos Adictivos - RTA, que pertenece a las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud - RETICS muestra que los pacientes que solicitan tratamiento por primera vez presentan un trastorno grave y en promedio, empiezan el tratamiento 30 años después del inicio en

el consumo de alcohol (8).

El evidente impacto del TUA en la morbilidad y mortalidad precoz dan idea de la importancia en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Identificar patrones de consumo perjudiciales y evaluar la comorbilidad de forma temprana pueden evitar la progresión de las enfermedades asociadas y reducir la mortalidad (2,5,9,10). De hecho, en la práctica clínica se dispone de un gran número de oportunidades para realizar intervenciones preventivas y promover el tratamiento (11–14). Diferentes estudios han demostrado que el abordaje integral del alcoholismo va unido a una reducción del riesgo de mortalidad incluso en pacientes con consumos de larga evolución (15,16).

### **1.1 Complicaciones asociadas**

El consumo excesivo de alcohol ha sido identificado como un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad según los estudios de carga de enfermedad llevados a cabo por la OMS (17). Actualmente, el abuso de alcohol es uno de los mayores problemas de salud pública en los países desarrollados contribuyendo con cerca de 79,000 muertes anuales en Estados Unidos y de 1,500,000 en todo el mundo (18,19).

La mortalidad atribuida al alcohol agrupada en tres grandes categorías como son el cáncer, la cirrosis hepática y las muertes no naturales, constituye el 2.8% de todas las causas de muerte en el mundo y el 3% de pérdida potencial de años de vida. Estas cifras se han incrementado desde los años 90 al 2010, sugiriendo que el alcohol es un factor de riesgo significativo en la mortalidad global (19).

Los estudios de causalidad relacionan el consumo de alcohol con más de 200 enfermedades; esta causalidad puede ser parcial o completa dependiendo de la presencia de otras condiciones de riesgo, como por ejemplo el tabaco, la hipertensión arterial, la dislipidemia o la hepatopatía. Además, existe una relación directa entre la cantidad de consumo de alcohol y el riesgo de morbilidad y mortalidad (17).

El consumo de riesgo, descrito según la OMS como el consumo regular de 20 a 40g diarios en mujeres y de 40 a 60g/día en hombres (20), está estrechamente asociado con más de 25 enfermedades crónicas, incluyendo la hepatopatía alcohólica, la pancreatitis, el síndrome alcohólico fetal y la enfermedad cardiovascular (21). En el caso de la enfermedad cardiovascular, el abuso de alcohol incrementa el riesgo de fibrilación auricular, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva de forma independiente a los factores clásicamente relacionados con estas patologías (22). También existe una sólida evidencia científica entre la exposición al alcohol y el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer, entre los cuales están el hepático, mama, tracto respiratorio y digestivo alto (boca, orofaringe, hipofaringe, esófago), páncreas o colon (23,24).

En un estudio longitudinal de nuestro grupo de trabajo realizado en más de 600 pacientes que solicitaron tratamiento para el TUA, se observó que la mortalidad global fue unas 20 veces mayor que la de la población general de la misma edad, siendo las principales causas de muerte la hepática, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares; también se observó que morían más aquéllos que en el momento del ingreso para tratamiento del trastorno presentaban elevada comorbilidad según una escala de calificación de enfermedad acumulada adaptada al abuso de sustancias (*Cumulative Illness Rating Scale Substance Abuse – CIRS-SA*) (25).

El consumo crónico de alcohol genera una serie de procesos metabólicos que favorecen la inestabilidad de lípidos y proteínas, y altera el metabolismo de vitaminas y cofactores. La generación de radicales libres, de aductos proteicos y el catabolismo del ácido retinoico (Vitamina A) son los principales mecanismos descritos en la carcinogénesis, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad del alcohol (26,27). Además, la disminución en la absorción y alteración del metabolismo de factores necesarios para múltiples procesos intracelulares (vitaminas del complejo B, cisteína, metionina) presentan una traducción clínica evidente (28,29).

La relación entre los déficits carenciales y sus manifestaciones clínicas en el paciente con alcoholismo crónico está bien establecida; el déficit agudo de tiamina con el síndrome de Wernicke-Korsakoff (30,31), el déficit de ácido fólico y vitamina B12 con el desarrollo de anemia megaloblástica y deterioro cognitivo (32,33), la asociación del déficit de folato con la patogénesis y progresión de la hepatopatía alcohólica (34,35), o el papel de la hipofolatemia en el polimorfismo genético implicado en la enfermedad cardiovascular, psiquiátrica y cáncer son algunos ejemplos (36).

En paralelo al desarrollo de la presente Tesis doctoral por compendio de artículos publicados, se ha profundizado en el estudio de alguno de estos aspectos. En concreto, en una serie contemporánea de pacientes admitidos para tratamiento del TUA se ha observado que uno de cada 4 presenta déficit sérico de ácido fólico y uno de cada 10 presenta déficit en los depósitos de la vitamina, y estas carencias se asociaron a macrocitosis y hepatopatía (37).

Por otro lado, se analizaron las características clínicas y el pronóstico a medio plazo de una serie de pacientes con diagnóstico de síndrome de Wernicke-Korsakoff por abuso de alcohol. En la serie de casos, se observó que una cuarta parte de los pacientes tenía hepatopatía; además, estos pacientes mostraban un elevado riesgo de muerte prematura y un 44.5% de las muertes fueron debidas a infecciones (38). De hecho, el alcohol favorece la susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas, la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) y la progresión de la enfermedad hepática en pacientes con infección por el VHC y por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (39–42).

En pacientes con abuso de alcohol también se ha observado mayor prevalencia de neumonía comunitaria por *Streptococcus pneumoniae*, que cursa de forma más grave en comparación a pacientes no consumidores de alcohol (43,44). Además, el consumo de alcohol es más frecuente en pacientes con tuberculosis pulmonar, y está relacionado con la transmisión de la enfermedad, resistencia al tratamiento



farmacológico y mayor mortalidad (45).

En este sentido, las infecciones víricas y bacterianas en pacientes con TUA se han visto relacionadas con estados crónicos inmunoinflamatorios y de hecho, las funciones celulares alteradas están presentes en la patogenia de una amplia variedad de complicaciones orgánicas del alcoholismo.

## **2. Generalidades del sistema inmunológico**

El sistema inmune, esencial para la defensa contra patógenos y para la regulación de las reacciones inmunes, requiere de una interacción compleja y coordinada entre sus dos principales componentes: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. A continuación detallaremos cada componente por separado, teniendo en cuenta los estudios de revisión más recientes y relevantes sobre el tema.

### **2.1 Inmunidad innata**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del huésped contra patógenos, genera una respuesta inmediata e inespecífica frente a la exposición a cualquier molécula identificada como antígeno y resulta en una activación celular y molecular que contendrán de forma inmediata la infección. Dentro de los componentes de la inmunidad innata se encuentran las barreras anatómicas, compuestas por el epitelio que recubre las superficies internas y externas del organismo, los fagocitos adyacentes a los epitelios y una serie de enzimas y péptidos antimicrobianos (46).

La respuesta innata consta de dos fases, la primera incluye una serie de moléculas solubles presentes en la sangre, el intersticio celular y el epitelio: enzimas, péptidos antimicrobianos y el sistema del complemento, que identificarán al patógeno para su posterior fagocitosis por los macrófagos. En la segunda fase, se genera una activación de las células detriticas y de los macrófagos a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

(PAMPs). Los receptores que reconocen los patrones moleculares, se denominan receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*) (PRRs); están presentes en los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células *natural killer* (NK) y se clasifican en cuatro grandes grupos dependiendo de su localización celular y de su función. Dentro del grupo de receptores de señalización ligados a membrana se encuentran los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*) (TLR), receptores ampliamente estudiados y que representan la evolución del sistema de defensa más antiguo de los mamíferos, capaces de reconocer patrones moleculares indispensables para la supervivencia de bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, virus y hongos (47).

La unión entre los PAMPs y los PRRs precipita una serie de señales intracelulares que resultarán en la activación de factores de transcripción necesarios para controlar la expresión de genes. Estos factores, una vez activados, codifican una serie de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión e inmunoreceptores, que favorecerán la activación, migración y reclutamiento celular y de moléculas efectoras en el sitio de la infección (48).

Ni el componente soluble (citoquinas, péptidos, complemento) ni el componente celular de la inmunidad innata son capaces de generar una memoria inmunológica que confiera protección a largo plazo, a no ser que el microorganismo o las moléculas tóxicas hayan superado estas primeras fases de defensa y se dé paso a una respuesta adquirida (46).

## **2.2 Inmunidad adquirida**

La inmunidad adquirida o adaptativa, es una respuesta retardada, compleja y específica que requiere de un contacto previo con el antígeno y de la generación de células de memoria. Presenta dos grandes componentes: el celular y el humoral.

Dentro del componente celular, los Linfocitos B (LB) y Linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> y los LT

CD8<sup>+</sup> (de ahora en adelante CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente) son los principales protagonistas, aunque en los últimos años se han descrito otras poblaciones menores con propiedades reguladoras y efectoras como son los LT dobles negativos (DN) (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) o los LT dobles positivos (DP) (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Los CD4<sup>+</sup> tienen un papel central en la inmunidad adquirida, dado que intervienen tanto en la activación de los CD8<sup>+</sup> y los macrófagos, como en la producción de anticuerpos por parte de los LB. El papel principal de los CD8<sup>+</sup> está en la eliminación de células infectadas por patógenos intracelulares y células tumorales. En cuanto a la inmunidad humoral, está mediada principalmente por los LB que, a través de la producción de anticuerpos específicos, eliminan microorganismos extracelulares. La figura 1 describe los diferentes mecanismos que integran la inmunidad innata y adaptativa para contener al patógeno.

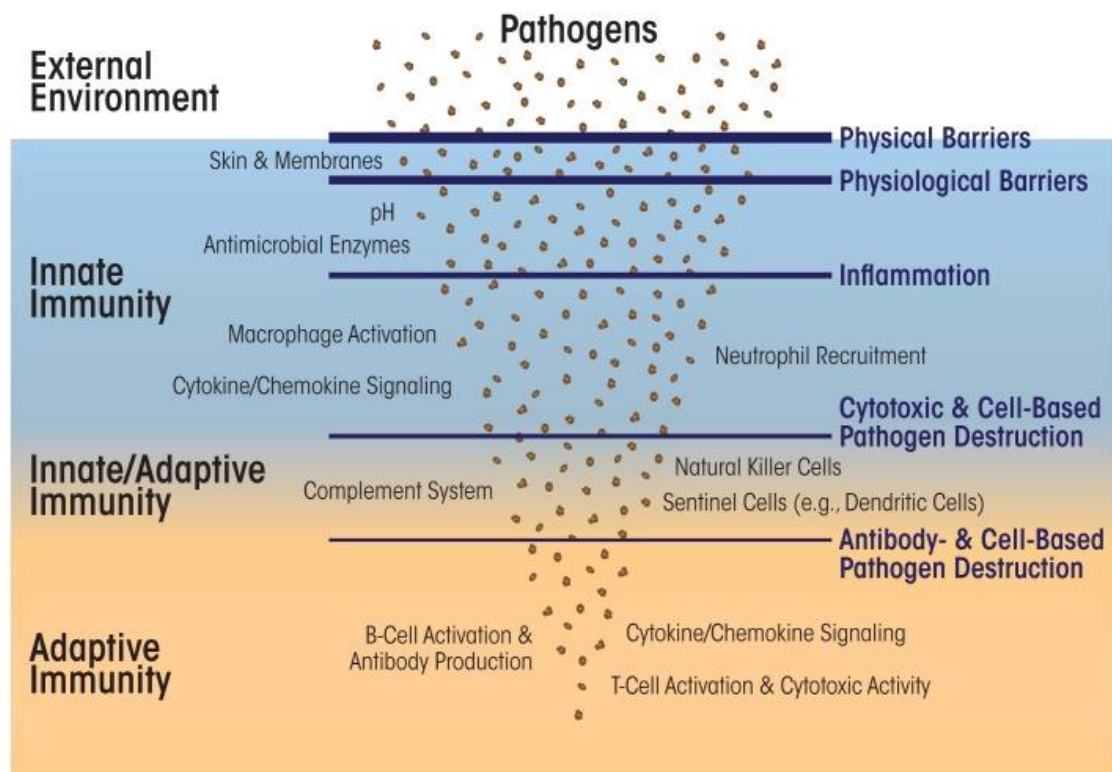


Figura 1. Visión general del sistema inmune.  
FUENTE: Spiering MJ. Alcohol Res 2015; 37:171-175 (49).

En los últimas décadas, trabajos centrados en caracterizar el fenotipo y las funciones del LT, así como las vías de diferenciación y su papel en la respuesta inmune, han llevado a describir su heterogeneidad, a generar nuevas clasificaciones, definir nuevas subpoblaciones con funciones y propiedades específicas y a describir la plasticidad que tienen estas células en adquirir distintas características según se requiera (50,51). Paralelamente, el creciente interés en las técnicas de inmunofenotipado ha generado consensos y recomendaciones que pretenden estandarizar técnicas y valores de referencia en la población general para las distintas subpoblaciones linfocitarias (52). A continuación se describen las subpoblaciones de LT y los procesos de maduración, activación y diferenciación.

### **2.2.1 Subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

La heterogeneidad de los CD4<sup>+</sup> es amplia y, de hecho, se continúan describiendo nuevas subpoblaciones que caracterizan tanto su fenotipo como su función. Actualmente, entre las principales subpoblaciones descritas de CD4<sup>+</sup>, se reconocen los LT *Helper* (Th)1, Th2 y Th17 que generan una respuesta específica según la clase de patógeno al que se han expuesto, los LT reguladores (Tr) esenciales para mantener la auto-tolerancia y regular la respuesta inmune y los LT foliculares que dan soporte al LB en la producción de anticuerpos (53). La diferenciación del CD4<sup>+</sup> dependerá de las propiedades de la célula *naive*, del tipo de antígeno, el tipo de citoquinas que produce y de los factores de transcripción que favorecen su linaje (54). La Figura 2 describe la plasticidad del CD4<sup>+</sup> para crear distintas poblaciones, todas ellas esenciales para generar una respuesta óptima ante la gran variedad de patógenos.

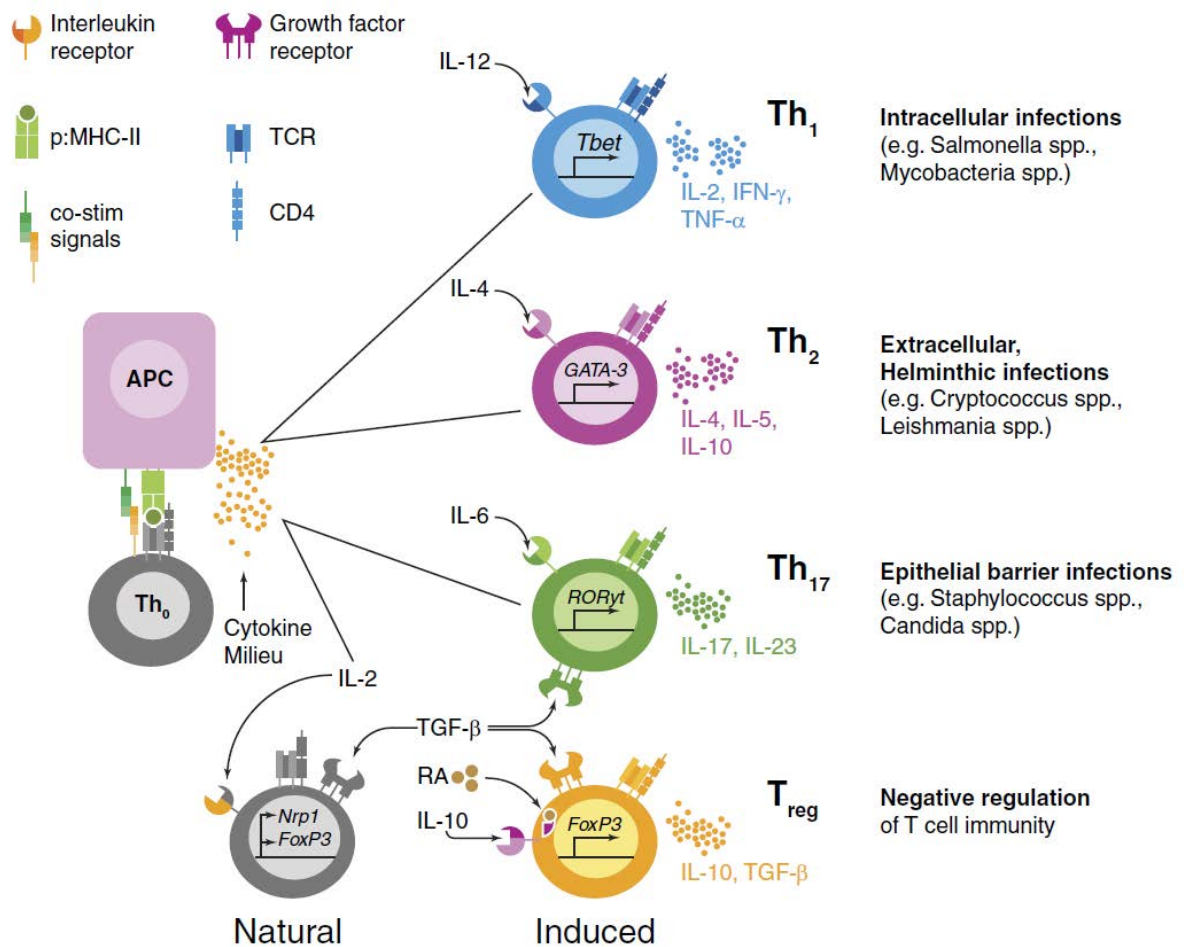


Figura 2. Heterogeneidad del CD4<sup>+</sup>.  
FUENTE: Cabrera-Pérez J, *et al.* J Leukoc Biol 2014; 96.(55)

En cuanto a las subpoblaciones de los CD8<sup>+</sup>, la respuesta Th1 favorecerá la diferenciación del CD8<sup>+</sup> en LT citotóxicos (Tc). Estos LT son especialmente importantes en la defensa contra patógenos intracelulares (virus y bacterias intracelulares) y son capaces de atacar directamente a las células infectadas. Una vez los CD8<sup>+</sup> reconocen la célula diana, se estimula su apoptosis a través de una serie de moléculas citotóxicas (perforinas, granzimas y granulosinas) las cuales, por medio diferentes mecanismos como la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la ruptura de la membrana mitocondrial y el daño a componentes intracelulares, promueven la muerte celular programada (46). El mecanismo de apoptosis o muerte

celular programada, es un proceso silencioso que no contribuye a estimular respuestas inmunológicas (46).

Los Tc producen además altas concentraciones de citoquinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) capaz de bloquear la replicación viral, de eliminar virus de células infectadas sin llegar a aniquilarlas y de aumentar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-Tipo 1). También producen factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*) (TNF)- $\alpha$  y linfotoxina- $\alpha$ , que junto al IFN- $\gamma$  son capaces de reclutar y activar macrófagos en el sitio de la infección.

### **2.2.2 Linfocitos DN y DP**

Durante el desarrollo de los LT en el timo, las células progenitoras se diferencian hacia células DN (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) o hacia DP (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) y por último a LT maduros CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, según la intensidad de las señales del receptor de células T (RCT). De las interacciones del RCT con los respectivos ligandos del CMH tipo I o tipo II, dependerá la selección a células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, respectivamente (56).

Las células DN representan cerca del 1-5% del total de LT periféricos en humanos y residen en órganos y tejidos específicos (57); en el hígado aumentan sus concentraciones después de un trasplante, alcanzan a ser hasta un 40% en condiciones autoinmunes y en el pulmón crecen sus concentraciones después de una infección (56). Se han analizado, además, sus valores según la edad, el género y el estilo de vida, observando que los niveles de DN son inversamente proporcionales a la edad, mayores en pacientes con actividad física e índice de masa corporal bajo y menores en consumidores de alcohol (58).

Se ha propuesto que las células DN que escapan de la selección negativa, migran del timo hacia la sangre periférica teniendo la capacidad de formar complejos peptídicos con el CMH, reconociendo antígenos y generando respuestas específicas (57). Zhang *et al.* (59), describen por primera vez las funciones inmunoregulatoras de las DN,

demostrando *in vitro* su capacidad de eliminar LT y LB activos, llevando a prolongar la supervivencia de injertos cutáneos y trasplantes de corazón en modelos murinos. Así mismo, se ha demostrado en humanos que las DN activas son capaces de suprimir la respuesta de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por medio de la transcripción de nuevas proteínas que detienen la maduración celular, sin llegar a eliminarlas. Para su acción requieren del contacto directo con la célula diana y de la estimulación del RCT para inducir una actividad supresora. Esta actividad parece ser distinta de la observada en otros LT reguladores, como son las Tr1, Th3 y CD8<sup>+</sup> supresoras, que actúan a través de citoquinas solubles como interleuquin (IL)-10 y el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor*) (TGF)- $\beta$  (60).

Diferentes estudios han demostrado que las subpoblaciones de LT poseen propiedades inmunoregulatorias en el marco de las enfermedades autoinmunes, enfermedades de injerto contra huésped y en el cáncer (61,62).

Por último, una pequeña proporción de LT circulantes con doble marcador de membrana (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) escapan del timo hacia la sangre periférica. Estas células poseen un papel efector y de memoria, y reaccionan con antígenos específicos de una amplia variedad de patógenos virales. Su proporción en sangre periférica se incrementa significativamente en pacientes con infecciones por el VIH o el Virus Epstein Barr (VEB) (63), además de ser re-estimuladas en pacientes con infección crónica por el VHC (64). Las células DP se han encontrado asociadas a tumores malignos o a condiciones autoinmunes como la esclerosis sistémica y se han aislado en biopsias cutáneas de pacientes con enfermedad de injerto contra el huésped, demostrando una actividad regulatoria y expresando altos niveles de IL-10 y bajos niveles de IL-2 y de IFN- $\gamma$  (65). Sin embargo, su papel fuera del timo todavía es desconocido.

### 2.2.3 Activación de los LT

Una vez los LT han madurado en el timo, circularán como células *naive* manteniéndose en esta fase durante largos periodos. Sin embargo, cuando la célula encuentra un antígeno extraño presentado por una célula presentadora de antígeno (CPA) a través del CMH, las señales del RCT cambian de ser sub-mitogénicas a presentar estímulos vigorosos que generan activación y proliferación (66).

El primer contacto de los LT *naive* con la CPA es en los ganglios linfáticos y a través de la expresión de moléculas de adhesión (LFA-1 y CD2) en el LT, que se unirán a moléculas de la familia de adhesión celular de las inmunoglobulinas (*Immunoglobulin Cell-Adhesion Molecules*) (ICAM) presentes en la CPA. Las señales de RCT generan un cambio conformacional que permitirán mantener una unión más estable entre el LT y la CPA.

Para que ocurra la activación de las células *naive* se requieren tres tipos de señales distintas. La primera es aquella generada entre la interacción del CMH y el RCT, la segunda señal se genera por la interacción entre la molécula CD28 en el LT y las moléculas B7 en la CPA; estas señales intervienen principalmente en la supervivencia y proliferación del LT. Por último, varias moléculas relacionadas con el CD28 y el receptor del TNF generarán señales coestimuladoras que intervendrán en la diferenciación del LT. Esta tercera señal es especialmente clave en la diferenciación de los distintos tipos de células efectoras (46).

Una vez ocurre la activación de las células *naive*, éstas entran en un ciclo rápido de división celular. La proliferación y diferenciación está dirigida principalmente por la IL-2 que se produce en las mismas células activadas. Las señales de CD28 favorecen la activación de factores de transcripción (AP-1, NFkB), los cuales incrementan la transcripción del ácido ribonucleico mensajero para la IL-2. Los LT, en ausencia de una segunda señal coestimuladora, son incapaces de generar IL-2 y entrarán en una fase de anergia o apoptosis. La anergia es uno de los procesos que explica la



tolerancia de los LT autorreactivos que escapan del timo hacia la circulación periférica (67).

Posterior a la proliferación de los LT, las células activadas se diferencian hacia células efectoras, capaces de sintetizar moléculas citotóxicas o necesarias para la activación de otras poblaciones diana como las Th. Las células activadas cambian la expresión de varias moléculas de superficie; por ejemplo, expresan mayor cantidad de moléculas de adhesión LFA-1, CD44 y CD2, lo que favorece la adherencia endotelial, la circulación periférica y la adherencia a células diana. Las células activadas presentan además un cambio en la isoforma del receptor CD45, expresando la isoforma CD45RO, hecho que sensibiliza al LT a concentraciones bajas del complejo CMH-péptido.

#### **2.2.4 Diferenciación y supervivencia de los LT**

Tanto para los CD4<sup>+</sup> como para los CD8<sup>+</sup>, la exposición transitoria al antígeno es suficiente para iniciar la proliferación y la diferenciación celular. Sin embargo, el desarrollo de la respuesta inmune, y por consiguiente, la generación de células de memoria y células efectoras, dependerá del tipo de patógeno, de la cantidad y tiempo en que se exprese el antígeno y del grado de coestimulación. La respuesta del LT debería ser controlada, manteniendo un balance entre las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y por tanto, un equilibrio entre los efectos protectores y proinflamatorios (68).

Las células de memoria comparten una serie de propiedades que las diferencian de las células *naïve* y las células efectoras; estas propiedades incluyen reactivación rápida después de la re-exposición al antígeno, potencial de proliferación alto y habilidad de sobrevivir sin el estímulo del antígeno a través del mecanismo de proliferación homeostática dirigido por la IL-7 y la IL-15 (68). Estas células de memoria se caracterizan además por la expresión de CD45RO y se identifican en sangre periférica por la expresión del CCR7<sup>+</sup>, molécula que media la migración de los LT

hacia nódulos linfáticos a través del endotelio de las vénulas.

Basados en la expresión de CCR7 se han propuesto dos tipos de células de memoria, los LT de memoria efectora (LT<sub>ME</sub>) y los LT de memoria central (LT<sub>MC</sub>). Los LT<sub>ME</sub> son CCR7<sup>-</sup> y están presentes en sangre, bazo y tejidos no linfoides, presentan una respuesta rápida ante la exposición al antígeno y producen grandes cantidades de moléculas efectoras; muchas de ellas están en un estado activado y son frecuentes en infecciones crónicas virales. Por otro lado, los LT<sub>MC</sub> son CCR7<sup>+</sup> y están presentes en los ganglios linfáticos, la sangre y el bazo, pero no en tejidos no linfáticos; tienen una respuesta más lenta en la producción de moléculas y se cree que tienen la capacidad. Se cree que la intensidad en las señales que recibe el RCT guiará la diferenciación hacia LT<sub>MC</sub> o LT<sub>ME</sub>. Además, los LB podrían ser claves en dirigir la diferenciación de las células de memoria (69).

Existen diferencias en el proceso de diferenciación del CD4<sup>+</sup> y el CD8<sup>+</sup>. El tiempo de exposición al antígeno que se requiere para iniciar un programa de proliferación de las células *naïve* CD8<sup>+</sup> parece ser mucho menor que el que se requiere para los CD4<sup>+</sup>; además, el CD8<sup>+</sup> inicia la división de forma más temprana y con mayor frecuencia. (70).

Aparte del origen de las subpoblaciones de los LT, un aspecto importante es el mantenimiento de éstas. En el caso del conjunto de las células *naïve* interviene un mecanismo llamado proliferación homeostática que consiste en una serie de estímulos procedentes de la unión de los LT con el CMH/self-p y la IL-7, que genera células con un fenotipo de memoria (66); estas células no parecen ser distintas de las que se generan tras la exposición a antígenos (71). En relación a las células de memoria, IL-7 e IL-15 son esenciales para su supervivencia; no obstante, a diferencia de las células *naïve*, las de memoria no requieren de las interacciones con el CMH.

El papel del antígeno en el mantenimiento de las células de memoria también se ha discutido. Modelos en ratones han demostrado que la infección viral persistente,

asociada a una carga antigénica elevada, conlleva mayor diferenciación celular y un agotamiento de las células de memoria siendo, además, funcionalmente inactivas. Por otro lado, la presencia continua de bajas cantidades de antígeno, resulta en el mantenimiento de células de memoria activadas (72).

### **3. Efectos del alcohol en el sistema inmunológico.**

El abuso de alcohol puede afectar a todos los componentes de la inmunidad innata y adaptativa, y lo hace a través de mecanismos de toxicidad directa o indirecta generados por el metabolismo del etanol.

El primer paso en la metabolización del alcohol es su oxidación a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). La ADH es la enzima responsable del metabolismo del alcohol cuando las concentraciones de etanol en sangre y en tejidos son bajas (73), convirtiendo el alcohol en acetaldehído, molécula tóxica y altamente reactiva. Durante esta reacción, se generan moléculas de hidrógeno que se transfieren a moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) convirtiéndolas en la forma reducida (NADH) (74). El exceso de NADH en la célula altera la relación entre NAD/NADH, favoreciendo un conjunto de desórdenes metabólicos. Estos desórdenes incluyen un aumento de la producción de ácido láctico, hipoglicemia, hiperlipidemia, hiperuricemia y un aumento en la producción de colágeno por parte de las células estrelladas (75).

Cuando los niveles de etanol superan en sangre los 50 mg/dL, interviene el sistema oxidativo microsomal (*Microsomal Ethanol-Oxidizing System*) (MEOS). Esta vía consiste en una serie de enzimas localizadas en estructuras esféricas, llamadas microsomas, y que se sitúan en el interior del hepatocito. Su actividad se incrementa sustancialmente con el consumo crónico de alcohol y es necesaria para la eliminación de moléculas extrañas del organismo. El componente más importante del sistema MEOS es el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) (76). El metabolismo del etanol, a través del CYP2E1, contribuye a un estado de estrés oxidativo que se caracteriza por

aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO), depleción de antioxidantes (glutación) y peroxidación lipídica. Estos cambios favorecen la activación celular del sistema inmune y se consideran la base en la patogénesis de la hepatopatía y la carcinogénesis (76).

El linfocito es capaz de adaptarse a la presencia de estresores ambientales, generando modificaciones en su propio metabolismo (77). Estas modificaciones incluyen, desde producción de citoquinas y moléculas citolíticas, hasta el desarrollo de la habilidad de migración y de división celular. Por ejemplo, en situaciones de privación de glucosa, se han descrito defectos funcionales del CD8<sup>+</sup> relacionados con defectos en la liberación de gránulos citotóxicos o en situaciones de estrés oxidativo; los RLO generados favorecen la activación de las células *naïve* hacia células efectoras.

Finalmente, la estructura y tamaño de la molécula de etanol permite atravesar fácilmente las membranas celulares y su distribución a los tejidos. Incluso ingestas moderadas pueden producir concentraciones de alcohol en sangre entre 10 y 20mmol/L. En este sentido, tanto los cambios moleculares y metabólicos generados por el alcohol, como la molécula en sí, pueden alterar todas las células del sistema inmunitario afectando al número, la función y la supervivencia de las mismas (39).

A continuación se detallan los efectos del alcohol en la inmunidad innata y adquirida, haciendo énfasis en esta última.

### **3.1 Efectos del alcohol en la inmunidad innata**

La exposición aguda al alcohol resulta en una disminución de la respuesta del TLR en las CPA, hecho que lleva a suprimir, de forma significativa, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente TNF- $\alpha$  e IL-1. Estos efectos se han descrito tanto en macrófagos alveolares como en monocitos periféricos y células dendríticas (78–80). Sin embargo, estos efectos inicialmente inhibitorios son transitorios, demostrando que

en la exposición crónica al alcohol hay una pérdida de la tolerancia de los TLR (tipo 4) y una mayor sensibilidad de las células ante los lipopolisacáridos (LPS), lo que promueve la activación de vías pro-inflamatorias, con la consecuente repercusión clínica y biológica (39). En concreto, la activación de monocitos y macrófagos juega un papel importante en la patogénesis de la hepatopatía alcohólica (81), siendo ésta debida a una exposición excesiva a antígenos intestinales, a una disminución de la depuración de antígenos hepáticos, o a la generación de RLO que favorecen la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (82).

También se ha descrito en el alcoholismo crónico la supresión de citoquinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) GMC-SF que estimula la producción de granulocitos en la médula ósea, la supresión de sCD40, factor soluble necesario para la activación plaquetaria, y la cascada de coagulación, y citoquinas hematopoyéticas como la IL-12, el factor de crecimiento de fibroblastos-2 y la proteína quimioatrayente de monocitos, necesarias para la activación de monocitos y linfocitos en la cicatrización de heridas (83).

Por otro lado, la exposición aguda al alcohol suprime el reclutamiento de células polimorfonucleares en el pulmón y disminuye su actividad fagocítica (84,85), favorece la disminución en el número y función de las células dendríticas circulantes y altera su diferenciación; estos mecanismos se han relacionado como factores de virulencia para la infección por *Streptococco Pneumoniae* (43).

Por último, existe un amplio estudio de la interacción del alcohol con las células NK, relacionadas con la progresión del daño hepático y fibrosis (86). Se ha demostrado que la actividad de las células NK puede suprimirse por la exposición crónica al alcohol; y disminuir así el efecto inhibitorio de las células NK sobre la fibrosis hepática (87). Sin embargo, hay estudios contradictorios que demuestran que la exposición de células NK al alcohol puede resultar en un aumento de su actividad citotóxica (88). En

2010, Laso *et al.* (89), describieron que las células NK de bebedores sin enfermedad hepática presentaban un aumento de su actividad citolítica contra células hepáticas K562 (*in vitro*), asociado a una disminución del número total de NK en sangre periférica, particularmente aquellas con receptor CD158 y CD161 implicadas en el reconocimiento celular. Estos resultados plantean la hipótesis de una migración celular de las NK hacia los tejidos inflamados y un desequilibrio en la concentración de células citotóxicas.

### **3.2 Efectos del alcohol en la inmunidad adquirida**

El alcohol es capaz de alterar todos los componentes de la inmunidad adquirida. Afecta al número, desarrollo, función y supervivencia tanto de LT como de LB, además de favorecer la producción de anticuerpos auto-reactivos y reducir la producción de anticuerpos específicos (90). Este apartado se centra en los aspectos más relevantes de los efectos del alcohol en el LT.

Desde los años 60 se ha descrito la relación entre el consumo agudo y crónico de alcohol con la linfopenia periférica, tanto en humanos como en animales, además de describirse su carácter reversible y su relación con patrones de consumo de alcohol en atracones ("*binge drinking*") (91–95). En concreto, se ha observado que la linfopenia periférica asociada al consumo excesivo de alcohol tiene un carácter reversible en pacientes que se mantienen abstinentes más allá de 30 días (94), y se ha relacionado con patrones de consumo de alcohol en atracones, incluso en personas sanas y en adolescentes (95).

Al mismo tiempo que la linfopenia, la exposición al alcohol favorece la activación de los LT, el desequilibrio de subpoblaciones y la muerte celular por activación. La figura 3 muestra los principales efectos del alcohol en las subpoblaciones de LT.

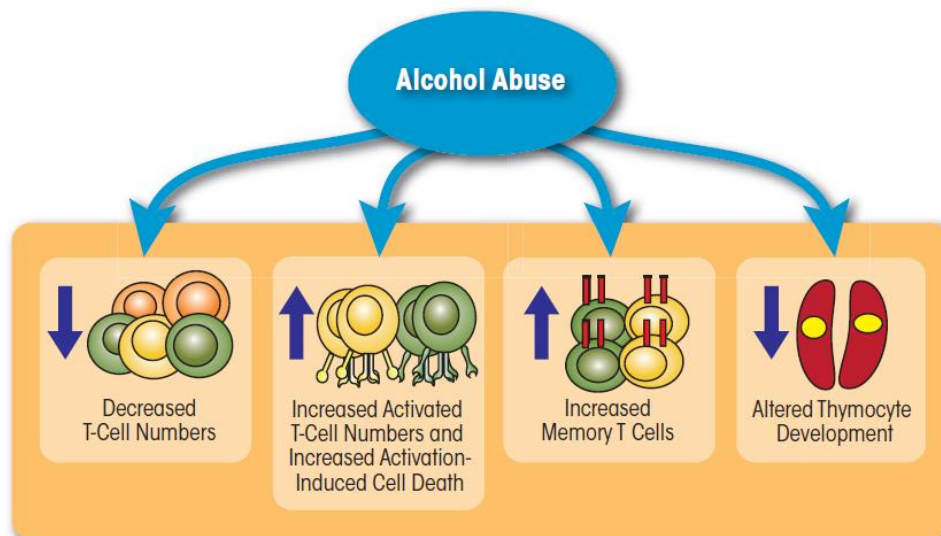


Figura 3. Afectación de los LT como consecuencia del abuso de alcohol.  
 FUENTE: Pasala S *et al.* Alcohol Res 2015;37:185-197. (90)

La disminución en el número circulante de linfocitos se ha descrito en pacientes con y sin hepatopatía y está justificada por múltiples factores. Uno de los mecanismos descritos es la toxicidad directa del alcohol sobre los precursores granulopoyéticos, ya sea debido a la fragmentación del DNA o a la falta de síntesis de aminoácidos (96). Otros factores como el déficit de folato contribuyen a la disminución de la actividad granulopoyética por parte de la médula ósea.

La malnutrición, frecuente en el paciente con TUA con y sin hepatopatía (97), e independiente de su origen (proteínas, minerales y/o vitaminas), también se ha relacionado con cambios en el sistema inmune. Estos cambios incluyen atrofia tímica, ya sea por apoptosis directa del timocito o por disminución en su proliferación, y alteración en la respuesta mediada por células, favoreciendo la frecuencia y severidad de infecciones bacterianas (98)

### 3.2.1 Activación de los LT

El mecanismo por el cual el consumo crónico de alcohol conlleva una activación de los LT no está bien establecido. No obstante, se ha identificado mayor interacción entre las CPA (monocitos y células dendríticas) y los LT, favoreciendo un fenotipo citotóxico (99,100). Además, se ha descrito una mayor expresión de marcadores de activación temprana y tardía (CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>), y mayor capacidad citotóxica de los CD8<sup>+</sup>, célula clave en la hepatopatía (101,102). En pacientes con TUA, el comportamiento de las combinaciones de marcadores de activación celular que se utilizan actualmente o las correlaciones clínicas con el exceso de activación linfocitaria, están por esclarecer.

Según el patrón de consumo de alcohol, se han identificado alteraciones en el fenotipo de los CD8<sup>+</sup>, presentando mayor activación temprana, menor sensibilidad a los LPS y menor capacidad migratoria en aquellos pacientes con patrones de consumo en atracones de alcohol en comparación con bebedores moderados (103). En pacientes con TUA, se han descrito subpoblaciones oligoclonales (CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup>) que son consecuencia de una estimulación persistente por auto-antígenos, por aductos proteicos del acetaldehído o por infecciones crónicas (104).

Paradójicamente, estos linfocitos CD8<sup>+</sup>, a pesar de estar más activados, parecen ser disfuncionantes. Modelos en ratones expuestos al alcohol y al virus de la Influenza, demuestran un defecto en la habilidad de liberar gránulos citotóxicos y en neutralizar antígenos específicos del virus (105). También se ha demostrado una disminución en la densidad y la respuesta de ciertas subpoblaciones de LT residentes en la piel, y una pérdida de la capacidad migratoria de los LT desde la circulación hacia los tejidos periféricos o linfáticos, tras estimularlos con moléculas bacterianas y endotoxinas (106,107).

El abuso crónico de alcohol se ha relacionado con defectos en la estimulación del LT por parte de las células dendríticas, específicamente con una disminución en la



expresión de citoquinas pro-inflamatorias y una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras, conllevando una falta de proliferación de las células *naive* (108).

### 3.2.2 Diferenciación de los LT

Tanto en modelos animales como en humanos, se han identificado alteraciones en el fenotipo y función de las subpoblaciones de LT en relación al consumo de alcohol. En pacientes con abuso crónico de alcohol existe una disminución del porcentaje de células *naive* (CD45RA) y un aumento del porcentaje de células de memoria (CD45RO); estas últimas, presentan además una expresión alterada de moléculas de adhesión (predominan CD11b respecto a L-selectin, cuando no sería lo habitual), y una mayor expresión de marcadores de activación (HLA-DR) (109). Así mismo, se ha observado una expansión de células efectoras (CD57<sup>+</sup>) que expresan mayor cantidad de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  como respuesta a la estimulación del RCT, independiente de una segunda señal (110). Aunque el mecanismo por el cual hay un mayor recambio celular no está establecido, podría estar mediado por citoquinas pro-inflamatorias (111).

Por otro lado, modelos en animales expuestos al alcohol han demostrado un cambio en el fenotipo de los LT. Song *et al.* (112), observó un incremento de las poblaciones CD44<sup>hi</sup> en ratones crónicamente expuestos (3-13 semanas), células compatibles con un fenotipo efector/memoria que presentan una mayor y más rápida respuesta de IFN- $\gamma$  y una mayor sensibilidad ante bajos niveles de estimulación del RCT (112). A pesar de haberse diseñado modelos de cultivo y de estimulación de los LT, el mecanismo por el cual estos linfocitos cambian su fenotipo, no está bien establecido, si bien se han propuesto diferentes vías. En primer lugar, la presencia de aductos proteicos que se generan del metabolismo del alcohol y que actúan como neoantígenos induciendo la activación y diferenciación del LT (113). Otro de los mecanismos es la activación estimulada de los LT por parte de los monocitos en el

momento en que presentan LPS (114). Por último, se ha descrito la proliferación homeostática como respuesta a una linfopenia periférica; en concreto, se ha observado que en ratones expuestos al alcohol no se alteró la expresión de marcadores de activación (CD69 y CD25) ni de moléculas coestimuladoras (CD28, CD153, CD137), las cuales se exhiben clásicamente tras la activación del LT (115).

La proliferación homeostática habitualmente obedece a una linfopenia que es, al menos en parte, causada por una disminución de células *naïve* que emigran desde el timo y refuerzan el recambio periférico para mantener la homeostasia (115).

El fenotipo de las células que se generan por el mecanismo de proliferación homeostática parece ser distinto del de las células de memoria que se generan tras la exposición al antígeno, expresando menor cantidad de proteínas que favorecen la supervivencia y mayor cantidad de IL-21, interleuquina clave en la expansión de células auto-reactivas. El mecanismo de proliferación homeostática también se ha relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes (116–118).

Con respecto a la diferenciación Th1/Th2/Th17 de las células de memoria CD4<sup>+</sup>, existen contradicciones en los trabajos publicados. En estudios con animales alimentados de forma crónica con alcohol, la secreción de IL-2 por los LT y células dendríticas se ha visto alterada al exponerlos a proteínas del VHC; además, se ha observado una respuesta suprimida de IFN- $\gamma$  al exponer directamente la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, sugiriendo que el alcohol inhibe la respuesta Th1.

Por otro lado, la intoxicación aguda por alcohol parece inhibir la respuesta Th17, suprimiendo la expresión de IL-23 en respuesta a la infección pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, alterando la producción de IL-17 a nivel pulmonar frente a la infección por *Streptococcus Pneumoniae*, o favoreciendo la respuesta Th2 (119–121).

Contrariamente, algunos experimentos en ratas alimentadas a base de alcohol demostraron que la expresión hepática de citoquinas Th1 (TNF- $\gamma$  e IL-12) presenta un patrón bifásico con un pico máximo a los 14 días de la ingesta, seguido de una

supresión de la respuesta Th1 y de nuevo un pico a los 35 días de ingesta. Esta secreción de citoquinas Th1 coincide con la aparición de cambios inflamatorios en el hígado (122). En pacientes con abuso crónico de alcohol también se ha observado un aumento en la producción de citoquinas Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$ ); sin embargo, estas alteraciones dependen de la existencia de hepatopatía y de la cantidad de alcohol consumida (123).

### **3.2.3 Apoptosis de los LT**

La activación de LT conlleva la apoptosis si la célula recibe una segunda señal en un periodo breve de tiempo. Este proceso, conocido como muerte por activación, es importante para mantener la homeostasis y la autotolerancia de los LT (124). En la exposición al alcohol se ha descrito la sensibilidad del LT a este mecanismo de apoptosis, favoreciendo la expresión de moléculas pro-apoptóticas (BAX) y disminuyendo la expresión de anti-apoptóticas (Bcl-2) que promueven la muerte por activación del LT, la fragmentación del ADN y la expresión de proteínas como la Caspasa-3 en los LT activados (125,126).

Un mecanismo adicional que contribuye a la apoptosis celular es la disminución de la expresión del receptor de vitamina D (RVD) (gen regulador de la transcripción) en los LT (127). La alteración de la expresión del RVD, favorece la expresión de RLO alterando el metabolismo mitocondrial (125).

En resumen, los estudios de las últimas décadas, demuestran que el alcohol altera las funciones de los LT y de los LB. El consumo crónico de alcohol resulta además en una linfopenia con una pérdida de linfocitos circulantes. El descenso de LT va acompañado de una proliferación homeostática, incrementando así la diferenciación, activación y conversión hacia fenotipos de memoria. La activación crónica del LT puede alterar su habilidad de reconocimiento y expansión ante la presencia de nuevos patógenos,

incrementando la susceptibilidad del organismo a infecciones de cualquier etiología. Además, estos cambios en el fenotipo favorecen una respuesta reguladora, situando al LT bajo un mayor control inhibitorio que predispone a su inestabilidad y apoptosis por activación. Esta inestabilidad en el ciclo del LT ha sido relacionada con el desarrollo de procesos neoplásicos (90).

El objetivo de la presente Tesis doctoral es caracterizar las alteraciones de los LT, célula clave de la inmunidad adquirida, en pacientes con TUA. Los resultados obtenidos se pueden ver reflejados en dos artículos científicos publicados en la revista *Drug and Alcohol Dependence*. Dicha revista se halla en el primer cuartil de la categoría *Substance Abuse* de *Journal Citations Reports®* a Diciembre 2017 y es la publicación oficial de *The College on Problems of Drug Dependence* (CPDD).

# HIPÓTESIS

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis**

En pacientes con consumo excesivo de alcohol no hay un cribado regular de la inmunidad celular, a pesar de observarse elevadas prevalencias de infecciones virales y bacterianas, de enfermedades con base inflamatoria, y cáncer. En este sentido, se plantean las siguientes hipótesis:

- En pacientes con TUA, las alteraciones linfocitarias pueden ser frecuentes aunque no presenten manifestaciones clínicas evidentes.
- Un exceso de activación podría explicar que el recuento periférico de las subpoblaciones de LT se vea alterado.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Analizar las alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias T en una serie de pacientes admitidos a tratamiento del TUA.

### **Objetivos secundarios**

- Describir las alteraciones cuantitativas más frecuentes de las principales subpoblaciones de LT (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, DP, DN) en pacientes con TUA.
- Establecer asociaciones entre las alteraciones cuantitativas de las principales subpoblaciones de LT y las características clínicas de los pacientes con TUA.
- Describir los fenotipos de activación de los LT en pacientes con TUA, utilizando la combinación de dos marcadores de membrana (HLA-DR y CD38).
- Establecer correlaciones clínicas y analíticas con la expresión de marcadores de activación linfocitaria.



## **PACIENTES Y MÉTODOS**

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se trata de pacientes con TUA que ingresaron consecutivamente para tratamiento en la Unidad de Adicciones del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona. Los pacientes eran remitidos desde centros de atención primaria del área del hospital. El tratamiento en el hospital se indicó en aquellos casos con fracaso del tratamiento ambulatorio y/o riesgo de presentar síndrome de abstinencia al alcohol.

A los pacientes se les realizaba una historia clínica del consumo de alcohol (cantidad, frecuencia y duración del trastorno) y de consumo de otras sustancias como opiáceos, cannabis o cocaína, de la comorbilidad y se les realizaba también una exploración física con datos antropométricos. En las primeras 24 horas del ingreso se realizaba una extracción de sangre para hemograma, bioquímica e inmunología y una ecografía abdominal.

El tratamiento farmacológico que se administraba durante el ingreso estaba basado en benzodiazepinas, vitaminas del complejo B y otros fármacos según la sintomatología de abstinencia al alcohol y la comorbilidad. Los pacientes permanecían ingresados seis días en promedio y al alta se aconsejaba psicoterapia individual y grupal, y en la mayoría de los casos tratamiento farmacológico con acamprosato, naltrexona o disulfiram.

Las determinaciones analíticas al ingreso incluían, parámetros de función hepática, reactantes de fase aguda, folato sérico, cobalamina, albúmina sérica y serologías de hepatitis B (HBsAg y HBcAc), VHC y VIH. La hepatopatía alcohólica se definió por la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: 1) elevación de AST ( $>74$  y  $<300$  U/L), 2)  $AST/ALT >2$  y 3) bilirrubina total  $> 1.2\text{mg/dL}$ .

Para los objetivos de la presente Tesis doctoral se excluyeron de los análisis aquellos pacientes con cáncer, infección por VIH y aquéllos que estuvieran bajo tratamiento inmunosupresor, incluyendo corticosteroides.

En concreto,

**Artículo 1.** Zuluaga et al. Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders. *Drug Alcohol Depend.* 2017;180:7-13.

Incluye una muestra de 238 pacientes ingresados en la Unidad de Adicciones entre 2002 y 2012.

**Artículo 2.** Zuluaga et al. Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2016;162:124 – 129.

Incluye una muestra de 60 pacientes ingresados en la Unidad de Adicciones entre 2013 y 2015.

### **Inmunofenotipado**

Para analizar la inmunidad celular se realizó inmunofenotipado de una muestra de sangre periférica de cada paciente, obteniendo valores absolutos y porcentajes de LT (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. A partir de Junio de 2007 se cuantificaron los linfocitos DN (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) y DP (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>).

En una tercera fase, a partir de 2013, se determinaron también subpoblaciones de activación y diferenciación celular. En concreto se obtuvieron cuatro perfiles de activación: (I) CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, (II) CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, (III) CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and (IV) CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> y cuatro perfiles de diferenciación: (I) *naïve* (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), T<sub>MC</sub> (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>), T<sub>ME</sub> (CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) y T<sub>EMRA</sub> (CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>). Además, se obtuvieron los siguientes fenotipos para CD4<sup>+</sup>: Th1 (CXCR3<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>), Th2 (CXCR3<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>) y Th17 (CXCR3<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup>).

### **Grupo control**

Para esta Tesis doctoral se utilizaron como referencia las subpoblaciones linfocitarias de una muestra de personas sanas que participaban en un estudio europeo que tiene como finalidad la estandarización de valores de referencia y técnicas de

inmunofenotipado. Dicho estudio, en el que participa el Servicio de Inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol, ha sido desarrollado por la *European Network for Translational Immunology, Research and Education/ENTIRE* y financiado por el programa *European Union Framework Program, Horizonte 2020, COST Actions* (128,129).

Las personas incluidas (44% hombres) eran donantes de sangre de raza blanca/caucásica, con una media de edad de  $38.8 \pm 11.4$  años. Para ser donante de sangre era requisito tener entre 18 y 50 años, peso superior a 50 kg y superar un cuestionario orientado a describir el estado general de salud física y mental, y cualquier factor de riesgo para donar sangre. En concreto, el cuestionario incluye preguntas relacionadas con las visitas médicas realizadas o previstas, uso de fármacos, estado de vacunaciones y antecedentes clínicos con especial atención en enfermedades infecciosas, conductas de riesgo, cirugías previas y viajes recientes (130).

### **Análisis estadístico**

Se realizaron análisis descriptivos de datos, así como un análisis bivariado para cada alteración linfocitaria de las subpoblaciones de LT. Se utilizaron pruebas de chi-cuadrado, F Fisher, t de Student y U-Mann Whitney, según conveniencia, para detectar diferencias significativas. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar correlaciones entre las distintas subpoblaciones de LT y demás variables continuas.

Para el primer trabajo presentado se usaron modelos de regresión logística con el fin de establecer predictores para las distintas alteraciones linfocitarias analizadas.

Para los objetivos del segundo estudio, se elaboró un indicador de activación linfocitaria (IA) definido como el cociente de células CD8<sup>+</sup> no activas (CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>) respecto a las células CD8<sup>+</sup> con doble marcador de activación (CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>), de

forma que los pacientes con valores más bajos del IA presentan mayor presencia de activación linfocitaria.

Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico fue realizado con SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) y Stata software (versión 11.1, College Station, Texas, USA).

# RESULTADOS

## RESULTADOS

### Artículo 1.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

Este estudio estaba basado en una muestra de 238 pacientes con TUA ingresados en la Unidad de Adicciones entre 2002 y 2012, el 80% de los cuales eran hombres con una mediana de edad al ingreso de 43 años [rango intercuartil (RIQ): 38-51 años] y presentaban un índice de masa corporal de 24 kg/m<sup>2</sup> [RIQ: 21-7-27.7 kg/m<sup>2</sup>]. En promedio, el consumo de alcohol era de 180 g al día [RIQ: 120-200 g/día] y la duración del consumo excesivo de alcohol de 18 años [RIQ: 9-25 años]. Globalmente, un 16.4% de los casos tenían infección por VHC y 14% hepatopatía alcohólica por criterios biológicos. La mediana de linfocitos totales fue 2.1 cel/μL [RIQ: 1.6-2.6].

Un 50% de los pacientes con TUA mostraban linfocitos DN bajos (<34 x10<sup>9</sup>/L), siendo éste el hallazgo más frecuente entre todas las alteraciones cuantitativas analizadas. Un 23% de los pacientes tenían DP >52 cel/μL y un 8% DP <3 cel/μL. Un 13% presentaba linfopenia CD4<sup>+</sup> (<600 cel/μL) y 18.5% presentaban CD4<sup>+</sup> >1370 cel/μL. Finalmente, el 24% de los pacientes tenían CD8<sup>+</sup> > 735 cel/μL y únicamente un 5% mostraban CD8<sup>+</sup> <240 cel/μL.

En cuanto a los predictores de alteración de los LT, la edad al ingreso se asoció de forma independiente a la elevación de CD4<sup>+</sup>, siendo los pacientes más jóvenes los que presentan CD4<sup>+</sup> >1370 cel/μL (odds ratio (OR)=0.93, intervalo de confianza (IC)95%: 0.89-0.98). La elevación de CD8<sup>+</sup> se asoció con mayor albúmina sérica (OR=1.08, IC95%: 1.01-1.16) y el antecedente de haber consumido drogas por vía intravenosa (OR=2.70, IC95%: 1.10-6.67).

En este trabajo, las mujeres mostraron mayor probabilidad de presentar elevación de células DP que los hombres (OR = 3.53, IC95%: 1.31 – 9.53). Además, niveles bajos de DN en este estudio se asociaron a una disminución de albúmina sérica (OR = 0.88, IC95%: 0.81 – 0.97).



**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Martínez-Cáceres, E; Teniente, A; Tor, J; Muga, R.

Over-expression of CD8<sup>+</sup> T-cell activation is associated with decreased CD4<sup>+</sup> cells in patients seeking treatment of Alcohol Use Disorder.

Drug Alcohol Depend. 2017;180:7-13.

**Artículo 2.**

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.

Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.

Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

Se incluyeron 60 pacientes con TUA admitidos para tratamiento entre 2013 y 2015 (83% hombres); la edad al ingreso fue 49 años [RIQ:44-54 años] y la mediana de consumo de alcohol al día fue de 145 g [RIQ:90-205 g].

Los pacientes con TUA presentaban una media  $\pm$  desviación estándar (DE) de CD3<sup>+</sup> de  $1,349 \pm 620$  cel/ $\mu$ L, CD4<sup>+</sup> ( $844 \pm 430$  cel/ $\mu$ L) y CD8<sup>+</sup> ( $434 \pm 225$  cel/ $\mu$ L) similares a los valores observados en controles sanos. Cabe destacar que los pacientes con TUA presentaron mayor número absoluto y porcentaje de DP que los controles sanos ( $27 \pm 37$  cel/ $\mu$ L vs.  $14 \pm 18$  cel/ $\mu$ L,  $p=0.02$ ) y menor número absoluto y porcentaje de DN ( $2.4 \pm 1.9$  cel/ $\mu$ L vs.  $5.2 \pm 4.3$  cel/ $\mu$ L,  $p<0.001$ ).

Dentro de los CD8<sup>+</sup>, la media  $\pm$  DE para el fenotipo de activación CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> fue  $50.3 \pm 50.6$  cel/ $\mu$ L en pacientes vs.  $33.5 \pm 24.5$  cel/ $\mu$ L en controles sanos ( $p=0.03$ ); la media  $\pm$  DE para CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> fue  $61 \pm 62.2$  cel/ $\mu$ L en pacientes vs.  $21.2 \pm 17.3$  cel/ $\mu$ L en controles ( $p<0.001$ ); la media  $\pm$  DE para el perfil CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> fue  $20.2 \pm 15.6$  cel/ $\mu$ L en pacientes vs.  $10.8 \pm 10.3$  cel/ $\mu$ L en controles sanos ( $p<0.001$ ).

Se observó una correlación inversa entre el fenotipo CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> y el número absoluto y porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> ( $r^2=0.37$ ,  $p=0.003$ ;  $r^2=0.30$ ,  $p=0.018$ , respectivamente). El indicador de activación se correlacionó de forma positiva con el nivel de creatinina sérica ( $r^2=0.104$ ,  $p=0.012$ ); el 73.5% de los pacientes con esteatosis hepática mostraron exceso de activación de los CD8<sup>+</sup> en comparación a aquellos sin esteatosis (52%) ( $p=0.088$ ).

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.



**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

**Zuluaga, P;** Sanvisens, A; Teniente, A; Fuster, D; Tor, J; Martínez-Cáceres, E; Muga, R.  
Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders.  
Drug Alcohol Depend. 2016;162: 124 – 129.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Esta Tesis doctoral por compendio de artículos publicados demuestra que existen alteraciones cuantitativas y cambios en el fenotipo de los LT en pacientes con TUA. Es evidente que múltiples procesos biológicos se integran para definir la señalización de los LT, su regulación genética, su función y su metabolismo, y que en el paciente con TUA, son varios los mecanismos a través de los cuales el alcohol afecta el sistema inmunológico (39).

En relación con el estudio de las subpoblaciones linfocitarias, hay que tener presente que se ha reportado una gran variabilidad en función de la edad, sexo, región geográfica y estado nutricional (131–133). Además, estas diferencias pueden estar asociadas con variaciones en la técnica, el sesgo de selección u otros factores individuales que pueden afectar al sistema inmune (estrés, hábitos tóxicos, infecciones subclínicas) (98,134).

En todo caso, cabe recordar que la presente Tesis doctoral se ha desarrollado siguiendo los protocolos de un estudio europeo de estandarización de técnicas de inmunofenotipado y un grupo de controles sanos (128,129).

### **Alteraciones cuantitativas de las subpoblaciones de LT**

Se ha demostrado que en pacientes con TUA existe un recuento bajo de DN y un recuento alto de DP, si se compara con controles sanos. Si bien el papel de los DN como células de memoria y reguladoras no está completamente definido en ciertas patologías (135); su actividad inmunoregulatoria y su elevada plasticidad podrían ser clave en el diseño de terapias celulares de ciertos modelos de enfermedad como neoplasias hematológicas o enfermedad de injerto contra el huésped (62). Los bajos niveles de DN se han correlacionado con una progresión de la enfermedad en pacientes con infección crónica por el VIH y con recuentos bajos de CD4<sup>+</sup> (<350 cel/ $\mu$ l) (136,137). Por otro lado, altos niveles de DN capaces de secretar citoquinas similares



a las secretadas por las células CD4<sup>+</sup> (IL-4, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y mantener funciones Th, se han involucrado en la prevención de la progresión del *Simian Immunodeficiency Virus* y en el control de la primo-infección en pacientes con VIH-1 (138,139).

Los bajos niveles de DN en sangre periférica de los pacientes con TUA podrían ser o bien una consecuencia de la toxicidad directa del alcohol sobre las células que salen del timo, o bien el reflejo de una pérdida de la regulación del sistema inmune como consecuencia de una activación persistente (96,140). Se ha descrito además el papel de los DN en contrarrestar los CD8<sup>+</sup> activos y de modular su activación por medio de la producción de TGF- $\beta$ 1/IL-10 (138). En la presente Tesis, se ha observado una correlación positiva entre el número absoluto de DN, DP y CD8<sup>+</sup>, sugiriendo el papel de estas poblaciones en la regulación del sistema inmune.

Uno de cada cuatro pacientes con TUA presenta valores altos en el número absoluto y en el porcentaje de DP.

Los resultados muestran que la alteración en los DP en los pacientes con TUA está asociada con el sexo. En concreto, las mujeres tienen mayor probabilidad de tener DP altos que los hombres. Estudios previos en población general no han observado diferencias en las poblaciones DN y DP en función del sexo, a pesar de que se ha descrito que las mujeres tienen tendencia a presentar mayor número de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que los hombres (58,133). Hay evidencias sobre el papel de los estrógenos en las diferencias de sexo observadas en relación al metabolismo y sensibilidad al alcohol; en concreto, el efecto protector de los estrógenos sobre el sistema inmune es inhibido por el alcohol (141). Como se ha comentado anteriormente, los DP se han asociado a activación crónica del sistema inmune en el contexto de infecciones persistentes, enfermedades autoinmunes y a tumores, pero su rol en las mujeres con TUA deberá ser dilucidado (64,142).

La edad tiene un especial protagonismo en el sistema inmune; en pacientes con TUA hemos observado un recuento mantenido de CD4<sup>+</sup> en los pacientes más jóvenes y una

tendencia a tener menor número de DN a mayor edad. Múltiples estudios han descrito los mecanismos por los cuales la edad genera cambios funcionales en el sistema inmune, y en concreto cómo contribuye a una pérdida funcional de LT (143,144). La edad está relacionada directamente con una involución o atrofia del timo, disminuyendo no solo en tamaño sino en celularidad, y generando, a medida que avanzan los años, menos LT maduros (145).

Otro hallazgo interesante en nuestro estudio es que el 13% de la serie de 238 pacientes presenta recuentos bajos de CD4<sup>+</sup> (<600 cel/ $\mu$ l); este resultado pone de manifiesto que una parte de los pacientes con TUA están a riesgo de desarrollar infecciones oportunistas (146). Son varios los procesos descritos que contribuyen a la linfopenia CD4<sup>+</sup> como son el exceso de citoquinas pro-inflamatorias y de RLO (sepsis) o de metabolitos tóxicos (isquemia e hipoxia tisular) (77). En estas situaciones, el sistema inmune es capaz de generar respuestas para favorecer la proliferación y restauración de los niveles de CD4<sup>+</sup> (66); sin embargo, una proporción de pacientes se mantendrán linfopénicos, con una reducción en la capacidad de reconocer nuevos antígenos (147).

Por otro lado, la linfopenia CD4<sup>+</sup> se asocia de forma inversa con abuso de cocaína. Son varios los trabajos de laboratorio que describen la relación entre las alteraciones de la inmunidad adaptativa y el uso de esta droga (148,149). En humanos, los estudios publicados muestran resultados contradictorios; por un lado no han demostrado diferencias en el número de subpoblaciones de LT, LB o NK en función del consumo de cocaína (150,151), mientras que el número de CD4<sup>+</sup> basal y durante el seguimiento se ha reportado mayor en pacientes expuestos a la marihuana, cocaína y otras drogas (151). Los datos aquí presentados van en sentido contrario, si bien no se analizaron en función de la cantidad de cocaína consumida ni la duración del consumo, limitando el poder determinar en qué sentido la cocaína afecta al recuento de CD4<sup>+</sup>.

Los CD8<sup>+</sup> son esenciales para el control de infecciones agudas y para controlar

infecciones persistentes, confiriendo protección a largo plazo para re-exposiciones virales. En nuestro estudio, niveles elevados de CD8<sup>+</sup> se han visto relacionados con haberse inyectado drogas. Esta asociación podría explicarse por una sobreestimulación del sistema inmunitario en pacientes que se inyectan sustancias y pueden quedar expuestos a infecciones como VHC, extremadamente prevalente en esta población (152,153). Dicha estimulación antigénica persistente podría explicar además la correlación positiva entre DP y DN con los CD8<sup>+</sup> que se ha comentado anteriormente; esta correlación podría ser el resultado de una estimulación RCT o de una diferenciación de células activas (CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>) hacia células reguladoras o células efectoras (DP o DN) (56,154).

Por último, señalar también que la probabilidad de tener DN bajos y CD8<sup>+</sup> elevados se ha asociado con la albúmina sérica, insinuando la posible relación entre nutrición, metabolismo celular y regulación de los LT.

### **Marcadores de activación de LT**

El segundo trabajo demuestra que los pacientes con TUA tienen mayor expresión de marcadores de activación de LT, si se compara con controles sanos. En concreto, presentan mayor expresión de CD38<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> en los CD8<sup>+</sup> y esta expresión se correlaciona de forma inversa con el número absoluto y porcentaje de CD4<sup>+</sup>.

Son varios los mecanismos a través de los cuales el alcohol pudiera favorecer la activación de los LT, si bien muchos de ellos no están del todo dilucidados (155). Los aductos proteicos y radicales libres generados del metabolismo del alcohol pueden ser una fuente de antígenos capaces de producir anticuerpos específicos (156). Además, el aumento de endotoxinas en la circulación sistémica y portal, que contribuye a un estado pro-inflamatorio, también favorece la activación inmunitaria (157).

Un hallazgo interesante es la relación inversa entre el porcentaje de CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> /HLA-DR<sup>+</sup> y el número absoluto y porcentaje de CD4<sup>+</sup>, planteando la posibilidad de que

a mayor activación de los LT, en concreto de los CD8<sup>+</sup>, hay una pérdida tanto en proporción como en número absolutos de CD4<sup>+</sup>. Esta relación pudiera ser uno de los mecanismos que explican la linfopenia de los pacientes con TUA, y en consecuencia, la mayor predisposición y peor curso clínico de infecciones virales y bacterianas (39). En este sentido, la constante activación inmunológica favorecida probablemente por una estimulación antigénica persistente, podría alterar la homeostasia de los LT y favorecer el agotamiento inmunológico.

En todo caso, nuestro indicador de activación linfocitaria basado en los dos marcadores analizados (CD38 y HLA-DR) permitiría identificar a pacientes con mayor riesgo de inmunodeficiencia ya que su marcada relación con la disminución del número absoluto de CD4<sup>+</sup> es señal de una disregulación del sistema inmune que puede conllevar a un agotamiento del mismo.

Finalmente, los pacientes con mayor activación linfocitaria CD8<sup>+</sup> presentan niveles de creatinina sérica bajos y mayor proporción de esteatosis hepática. Dentro de la patogénesis de la hepatopatía alcohólica, la activación de la inmunidad innata contribuye al inicio y progresión del daño hepático. Los diversos factores implicados (LPS, células de Kupffer, sistema del complemento) activan la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y RLO que causaran daño hepatocelular (158).

El papel de la inmunidad celular en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica es menos reconocido; se ha descrito un aumento de anticuerpos contra aductos de la peroxidación lipídica, un aumento del número de LT en el hígado y una activación de la inmunidad adaptativa por parte de aductos proteicos (159).

La correlación inversa con los niveles de creatinina pudiera estar justificada en el contexto de la desnutrición proteica de estos pacientes más que con la alteración en la tasa de filtrado glomerular. Si bien no se describe en los resultados, ningún paciente presentaba insuficiencia renal.

Actualmente, se está trabajando en un tercer artículo cuyo objetivo es analizar la

diferenciación de LT en 79 pacientes con TUA y los resultados obtenidos sugieren que estos pacientes presentan una diferenciación celular hacia poblaciones más maduras en comparación con los controles sanos. En concreto, los pacientes con TUA presentan menos poblaciones *naive* (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) y más poblaciones de memoria, tanto LT<sub>MC</sub> (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), como LT<sub>ME</sub> (CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) en los CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Además, en el paciente con TUA hemos podido observar un aumento de todas las poblaciones Th1, Th2 y Th17, con mayor expresión de poblaciones Th2 respecto a personas sanas.

### Limitaciones

Los estudios presentados en esta Tesis tienen varias limitaciones que deben ser mencionadas. En primer lugar, se trata de diseños transversales en pacientes que ingresan para tratamiento de TUA; las muestras de sangre periférica se obtuvieron en las primeras 24 horas de ingreso y no se analizan cambios posteriores una vez se consigue la abstinencia al alcohol. Por otro lado, si bien se excluyeron pacientes con infección por VIH, cáncer, tratamiento inmunosupresor o con enfermedades autoinmunes, factores como el consumo de otras sustancias podrían jugar un papel en las alteraciones inmunitarias; de hecho, el consumo de tabaco y cocaína se han asociado con alteración de CD4<sup>+</sup> (160,161). Finalmente, los estudios están limitados al análisis del fenotipo celular y no se acompañan de estudios *in vitro* para valorar la capacidad funcional de respuesta a mitógenos o la capacidad proliferativa.

En resumen, los pacientes con TUA presentan una alteración del número y fenotipo de los LT, con menos poblaciones DN, más poblaciones DP y más poblaciones activas expresadas mediante los marcadores CD38 y HLA-DR. Esta activación celular se correlaciona de forma inversa con el número y porcentaje de CD4<sup>+</sup>. Finalmente, los pacientes con TUA presentan menos poblaciones *naive* y más poblaciones de memoria y efectoras. Tanto la activación del LT como la linfopenia pudieran contribuir

a estos últimos hallazgos. Queda la pregunta sobre cómo estas alteraciones pudieran afectar la interacción con las demás células de la inmunidad innata y adquirida, y cómo contribuyen a la pérdida de una adecuada respuesta inmune, a la menor capacidad de reconocer nuevos antígenos y a la generación de auto-anticuerpos en los pacientes con abuso crónico de alcohol.

En todo caso, los resultados de esta Tesis plantean la necesidad de ampliar el debate sobre la utilidad de realizar pruebas de cribado inmunológico celular para identificar grupos de alto riesgo en pacientes con TUA, con el fin de enfocar en ellos todas las medidas preventivas. A pesar del esfuerzo y progreso en la prevención, los clínicos e investigadores tienen el reto de entender y tratar el daño sistémico ocasionado por el uso crónico de alcohol.

En concreto, es crucial entender la repercusión del alcohol en el sistema inmune y su relación con la patogenia de órganos relacionados. Conocer a nivel molecular y biológico las consecuencias del alcohol en el sistema inmune, resultaría efectivo para generar terapias que modulen la expresión de genes o modifiquen el estado redox de las células. Añadir la citometría de flujo en el proceso asistencial de los pacientes asintomáticos con TUA pudiera contribuir a identificar alteraciones del sistema inmune y a motivar una evaluación y seguimiento de las comorbilidades relacionadas (infecciones, cáncer, hepatopatía, hepatitis autoinmune, pancreatitis). Finalmente, analizar los cambios de expresión de estos marcadores una vez se consigue la abstinencia al alcohol, nos ayudaría a entender la reversibilidad del efecto deletéreo del alcohol en el sistema inmune.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de esta Tesis por compendio de artículos publicados son las siguientes:

- Alteraciones cuantitativas de todas las subpoblaciones de linfocitos T son frecuentes en pacientes que solicitan tratamiento del TUA. Edad, género, estado nutricional y consumo de otras sustancias, en especial cocaína, son factores asociados a dichas alteraciones.
- Más de la mitad de los pacientes presentan linfocitos DN bajos y en uno de cada cuatro se observan valores elevados de CD8<sup>+</sup> y de DP, hallazgos que pudieran relacionarse con el intento de regular el sistema inmune en condiciones de estimulación crónica. La linfopenia CD4<sup>+</sup>, presente en un 13% de los pacientes con TUA, pone de manifiesto una inmunodeficiencia secundaria que puede conducir a la aparición de infecciones oportunistas.
- Se demuestra un exceso de activación linfocitaria (CD8<sup>+</sup>) en los pacientes que solicitan tratamiento del TUA en comparación con individuos sanos; el exceso de activación se correlaciona de forma inversa con el recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, sugiriendo que la activación crónica del sistema inmunológico podría favorecer la linfopenia.
- El índice o marcador del exceso de activación linfocitaria propuesto, definido como el cociente de células no activas (CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>) respecto a las células con doble marcador de activación (CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>), puede ser útil en la práctica clínica cotidiana para identificar casos con mayor riesgo de inmunosupresión asociada al abuso de alcohol.



## **LÍNEAS DE FUTURO QUE SE DESPRENDEN DE LA INVESTIGACIÓN**

## LÍNEAS DE FUTURO QUE SE DESPRENDEN DE LA INVESTIGACIÓN

Son diversas las nuevas líneas de investigación generadas a partir de los estudios presentados en esta Tesis, o que siguen abiertas a discusión en esta línea de trabajo.

Una de las principales nuevas líneas de investigación que se desprende de los resultados, se basa en averiguar si las frecuentes alteraciones en los LT observadas en los pacientes con TUA son o no reversibles una vez el paciente se mantiene abstinentemente al alcohol.

Por otro lado, sería de especial interés conocer si la alteración en el número y fenotipo de los LT que observamos en sangre periférica, es el reflejo de lo que ocurre en los órganos más afectados por el abuso crónico de alcohol.

En relación al estudio de activación linfocitaria, la mayor expresión de marcadores de activación observada en pacientes con TUA nos obliga a preguntarnos a qué es debida, si a una mayor exposición a endotoxinas o a auto-antígenos o bien es consecuencia del aumento de RLO que favorece el metabolismo del LT. Además, sería interesante analizar cuál de los marcadores biológicos que se estudian actualmente (microbiota intestinal, estrés oxidativo, nivel de endotoxinas), se correlaciona mejor con la activación del sistema inmunológico en pacientes con TUA.

Algunos estudios han descrito que la activación persistente del sistema inmunológico se asocia a la presencia de infecciones virales latentes (VEB, CMV, VHC, VIH). Por otro lado, los resultados indican que también está asociada al TUA, hecho que nos lleva a querer analizar qué sucede en situaciones en las que concurren ambas condiciones.

De los dos trabajos que conforman la presente Tesis, se desprende que el estado nutricional de los pacientes con TUA pudiera jugar algún papel en el sistema inmune de estos pacientes. En este sentido, se abre la posibilidad de realizar diferentes estudios que analicen la desnutrición proteica en relación a las alteraciones de las

distintas subpoblaciones linfocitarias y que ayuden a entender de qué forma están asociadas estas dos condiciones.

Finalmente, y como derivada de los análisis que se están llevando a cabo sobre la diferenciación celular, nos preguntamos qué mecanismos contribuyen a que los pacientes con TUA presenten poblaciones más maduras, con la consecuente pérdida de poblaciones *naive*, y cómo afecta esta situación al reconocimiento de nuevos antígenos.

## **ANEXO 1**

**Publicaciones del candidato doctoral relacionadas con la  
Introducción**

## ANEXO 1. PUBLICACIONES DEL CANDIDATO DOCTORAL RELACIONADAS CON LA INTRODUCCIÓN

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Rivas, I; Rubio, G; Gual, A; Torrens, M; Short, A; Álvarez, FJ; Tor, J; Farré, M; Rodríguez de Fonseca, F; Muga R.  
Patients with alcohol use disorder: initial results from a prospective multicenter registry in the Spanish Network on Addiction Disorders. CohRTA Study.  
Adicciones. 2017;0(0):931  
Factor de impacto (*Journal Citation Report*, 2016): 2.077 (Q4)
- Muga, R; **Zuluaga, P**; Sanvisens, A; Rivas, I; Fuster, D; Bolao, F; Tor, J; Red de Trastornos Adictivos-RTA.  
Hepatitis C associated to substance abuse: ever closer to a treatment without Interferon.  
Adicciones. 2015;27:141-9.  
Factor de impacto (*Journal Citation Report*, 2015): 1.780 (Q4)
- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R.  
Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome.  
Alcohol Alcohol 2017;52:466–471.  
Factor de impacto (*Journal Citation Report*, 2016): 2.757 (Q2)
- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R.  
Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder.  
Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422.  
Factor de impacto (*Journal Citation Report*, 2016): 3.222 (Q1)

## Pacientes con trastorno por uso de alcohol: resultados iniciales de un registro multicéntrico en la Red de Trastornos Adictivos-RTA. Estudio CohRTA

### *Patients with alcohol use disorder: initial results from a prospective multicenter registry in the Spanish Network on Addiction Disorders. CohRTA Study*

ARANTZA SANVISENS\*, PAOLA ZULUAGA\* (ambas autoras participan por igual), INMACULADA RIVAS\*\*, GABRIEL RUBIO\*\*\*, ANTONI GUAL\*\*\*\*, MARTA TORRENS\*\*\*\*\*, ANTONI SHORT\*\*\*\*\*, FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ\*\*\*\*\*, JORDI TOR\*\*\*\*\*, MAGÍ FARRE\*\*\*\*\*, FERNANDO RODRIGUEZ DE FONSECA\*\*\*\*\*, ROBERTO MUGA\*\*\*\*\* Y COHRTA.

\* Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol-IGTP, Badalona; \*\* Centro de Atención a las Drogodependencias-Centro Delta, Institut Municipal de Serveis Personals, Badalona; \*\*\* Servicio de Psiquiatría, Hospital 12 de Octubre, Madrid. Universidad Complutense de Madrid; \*\*\*\* Servicio de Psiquiatría, Hospital Clínic, Barcelona, Universitat de Barcelona; \*\*\*\*\* Instituto de Neuropsiquiatría y Adicciones, Parc de Salut Mar, Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona; \*\*\*\*\* Unidad de Alcohol, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca; \*\*\*\*\* Servicio de Farmacología, Hospital Clínic, Valladolid, Universidad de Valladolid; \*\*\*\*\* Servicios de Medicina Interna y Farmacología Clínica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona; \*\*\*\*\* Instituto de Investigación Biomédica-IBIMA, Málaga.

#### Resumen

El Programa Alcohol de la Red de Trastornos Adictivos (RTA) requiere de un estudio clínico longitudinal para dar respuesta a preguntas de investigación en el trastorno por uso de alcohol. El proyecto CohRTA es un estudio multicéntrico de investigación cooperativa que se pone en marcha para mejorar la prevención secundaria y el diagnóstico precoz de los procesos patológicos asociados al trastorno por uso de alcohol.

**Método:** estudio observacional en cohorte multicéntrica de pacientes mayores de 18 años que solicitan tratamiento del trastorno por primera vez y autorizan su participación. La información clínica se recoge en una plataforma online diseñada para el estudio y puede ir acompañada de una muestra biológica que se deposita en un biobanco. Se recogen datos basales y prospectivos, sociodemográficos, epidemiológicos, clínicos y de tratamiento. A diciembre de 2015 son 10 los centros proveedores de pacientes y se espera reclutar más de 1.000 pacientes en los próximos años.

**Resultados:** se dispone de 344 pacientes (77% hombres) que cumplen los criterios de inclusión en el estudio y con una edad de 50 años (RIQ: 43-55 años). La edad de inicio de consumo de alcohol fue de 15 años (RIQ: 14-18 años) y un 61% tenían antecedente familiar de trastorno por uso de alcohol. Durante los 30 días previos al inicio del tratamiento los pacientes bebían 12.5 UBE/día (RIQ: 7.1-20 UBE/día), el 72% fumaba tabaco y el 30% consumía cocaína.

**Conclusiones:** Disponer de una cohorte abierta y multicéntrica de pacientes con trastorno por uso de alcohol será útil para analizar las consecuencias del abuso de alcohol, potenciar la investigación traslacional y añadir valor a la investigación clínica y básica del Programa Alcohol dentro de RTA/RETICS. Con una cohorte bien establecida y representativa se espera aumentar la cantidad y calidad científica en relación a las complicaciones del trastorno por uso de alcohol y sus consecuencias clínicas y sociales en España.

**Palabras clave:** Trastorno por uso de alcohol; Estudio de cohorte; Investigación.

#### Abstract

The Alcohol Program of the Spanish Network on Addictive Disorders-RTA requires a longitudinal study to address different research questions related to alcoholism. The cohort study (CohRTA) focuses on patients seeking treatment for alcohol use disorder, as a multicentre, collaborative research project aimed to improve secondary prevention and early diagnosis of pathological processes associated with the disorder.

**Methods:** multicentre cohort study in adults (>18 years) seeking their first treatment of the disorder. Patients sign an informed consent and data is collected in an online platform specifically designed for the study; patients are also requested to provide biological samples that are stored in a biobank. Baseline and prospective, socio-demographic, epidemiological, clinical and treatment data are collected. Currently there are 10 participating centres that expect to recruit more than 1,000 patients.

**Results:** As of December 2015, 344 patients (77% men) were included. Median age at admission was 50 years (IQR: 43-55 years). Median age at the start of alcohol consumption was 15 years (IQR: 14-18 years) and 61% of cases reported antecedents of alcohol use disorder in the family. During the 30 days prior to admission, alcohol consumption amounted to 12.5 SDU/day (IQR: 7.1-20 SDU/day), 72% of the patients were tobacco smokers and 30% currently used cocaine. Organising an open cohort of patients with alcohol use disorder may be crucial to better understand the clinical consequences of alcoholism in Spain. This cohort may potentiate quantitative and qualitative research within the Spanish Network on Addictive Disorders-RTA/RETICS. Having a well-established, representative cohort of patients will increase translational research on consequences of alcoholism in our country.

**Keywords:** Alcohol use disorder; Cohort study; Research.

Recibido: Marzo 2016; Aceptado: Octubre 2016.

#### Enviar correspondencia a:

Dr. Roberto Muga. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Ctra. Canyet s/n. 08916, Badalona  
E-mail: rmuga.germanstrias@gencat.cat

Pacientes con trastorno por uso de alcohol: resultados iniciales de un registro multicéntrico en la Red de Trastornos Adictivos-RTA. Estudio CohRTA

La Organización Mundial de la Salud estima que 76 millones de personas tienen abuso o dependencia de alcohol en el mundo (World Health Organization, 2010). En España, la prevalencia de consumo de alcohol es elevada, ya que el 79% de la población general entre 15 y 64 años ha consumido alcohol en el último año (84% de los hombres, 73% de las mujeres) y un 11% bebe alcohol diariamente según la encuesta domiciliaria de 2009-2010 (Observatorio Español sobre Drogas, 2011). Esta misma encuesta sitúa a los bebedores de riesgo (ingesta de alcohol superior a 50 gramos/día en hombres y 30 gramos/día en mujeres) en el 4,4% de la población general. En el grupo de edad entre 15 y 24 años, la prevalencia del consumo de alcohol de riesgo en mujeres es del 6% y en hombres del 5% (Observatorio Español sobre Drogas, 2011).

Los problemas de salud relacionados con el abuso de alcohol son relativamente frecuentes en la población española y por ello en el sistema sanitario. Además, cada año cerca de 30.000 personas solicitan tratamiento del trastorno y hasta un 61% de ellas se observa que también han consumido cocaína (Observatorio Español sobre Drogas, 2011).

El trastorno por uso de alcohol es una enfermedad crónica que puede cursar con múltiples alteraciones orgánicas. El daño que el alcohol causa en órganos y tejidos depende esencialmente de la cantidad total de etanol ingerida a lo largo de la vida y del patrón de consumo, aunque también intervienen variables genéticas, biológicas y ambientales; entre las principales alteraciones orgánicas del alcoholismo, ahora definido como trastorno por uso de alcohol según el DSMV (American Psychiatric Association, 2013), destacan las hepáticas, neuro-psiquiátricas, cardiovasculares, infecciosas y el cáncer; es más, el riesgo de padecer una enfermedad asociada al abuso de alcohol empieza con niveles relativamente bajos de consumo diario de alcohol (30g/día) (Thomas et al., 2000).

El pronóstico de los múltiples trastornos orgánicos derivados del abuso de alcohol también depende de diversos factores. El alcohol puede causar lesiones en órganos y sistemas tras un consumo prolongado pero también daño a corto plazo, tras ingestas de alcohol en atracones (*binge drinking*) o en el contexto de intoxicaciones etílicas. Existen también marcadas diferencias según el sexo ya que las mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad hepática que los hombres y en los últimos años se insiste también en el mayor riesgo de cáncer de mama en bebedoras habituales (Bagnardi, Blangiardo, La Vecchia, y Corrao, 2001). Por otro lado, el consumo exagerado de alcohol explicaría una parte importante de la mortalidad por lesiones no intencionadas (accidentes, ahogamiento, hipotermia, quemaduras), intencionadas (suicidio) u otras enfermedades graves que acarrearán una elevada mortalidad durante el episodio agudo (Naimi et al., 2003). En todo

caso, la mortalidad de pacientes con trastorno por uso de alcohol es elevada y puede llegar a ser hasta 20 veces superior a la de la población general de la misma edad (Fuster et al., 2015; Rivas et al., 2013; Roerecke y Rehm, 2013).

Otro aspecto a tener en cuenta en la epidemiología actual del trastorno por uso de alcohol es la concurrencia del consumo de otras sustancias, en particular de cocaína, cannabis y tabaco (Fuster et al., 2015; Observatorio Español sobre Drogas, 2011; Rivas et al., 2013). El consumo de cocaína en combinación con alcohol aumenta los niveles plasmáticos de cocaína en hasta un 30% con lo que ello implica en el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, amén de generar un intermediario metabólico, el cocaetileno de gran potencia psicotrópica y efectos cardiotoxicos (Pennings, Leccese, y Wolff, 2002). Desde una perspectiva conductual, el consumo de cocaína facilita el consumo de alcohol ya que consumir cocaína permitiría beber alcohol durante más tiempo, lo que a su vez puede incrementar la cantidad de cocaína consumida (Gossop, Manning, y Ridge, 2006).

Es bien sabido que la información clínica que aportan las series de casos es esencial para mejorar la calidad de la asistencia y actualizar el pronóstico de cualquier enfermedad. En ese sentido, disponer de una cohorte de casos con trastorno por uso de alcohol puede resultar clave para mejorar el tratamiento de la enfermedad y potenciar la investigación centrada en el paciente. De hecho, revitalizar la investigación clínica está en el orden del día de las agencias españolas y europeas de investigación; además, la asistencia a pacientes debiera ser el puente entre ciencia básica y efectividad clínica (Pons, Rodés, Andreu, y Arenas, 2013).

La Red de Trastornos Adictivos (RTA) es una de las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS) del Instituto de Salud Carlos III. Desde su inicio en 2003, los objetivos científicos de la RTA se centran en investigar en el trastorno por uso de sustancias y en la etapa iniciada en 2013, en las dos sustancias con mayor impacto en nuestra sociedad: alcohol y cocaína.

Desde el Programa Alcohol de la RTA se ha impulsado la creación de una cohorte multicéntrica para el estudio de pacientes que solicitan tratamiento del trastorno por primera vez (proyecto CohRTA). En los estudios de cohorte, los pacientes se seleccionan en función de una determinada característica o exposición y una vez visitados en la primera ocasión son seguidos en el centro de reclutamiento lo que permite analizar la evolución a largo plazo y la aparición de incidencias clínicas en función de distintos factores de exposición. Los objetivos y plan de actuación de este estudio de la RTA se han presentado en foros científicos de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) y de la Sociedad Científica Española de Estudios sobre Alcohol, Alcoholismo y otras Toxicomanías (Socidrogalcohol). Además del soporte económico del ISCIII, el proyecto CohRTA

Arantza Sanvisens, Paola Zuluaga, Inmaculada Rivas, Gabriel Rubio, Antoni Gual, Marta Torrens, Antoni Short, Francisco Javier Álvarez, Jordi Tor, Magí Farré, Fernando Rodríguez de Fonseca, Roberto Muga y CohRTA.

cuenta con financiación adicional del Plan Nacional sobre Drogas (PNSD) a través de las ayudas para la investigación de 2014; la ayuda adicional del PNSD ha supuesto la ampliación del proyecto a centros clínicos no pertenecientes a la RTA, lo que permitirá aportar un mayor número de casos a la cohorte y ampliar la validez externa.

El objetivo último del estudio es establecer una plataforma estable de centros asistenciales para potenciar el conocimiento clínico y básico en el trastorno por uso de alcohol.

## Metodología

### Diseño del estudio

CohRTA es una cohorte abierta, prospectiva y multicéntrica de adultos que solicitan tratamiento del trastorno por uso de alcohol por primera vez. El estudio está anclado en centros asistenciales del Sistema Nacional de Salud que pertenecen a la Red de Trastornos Adictivos de RETICS y en otros que manifestaron su interés en participar después de conocer la propuesta.

En su fase inicial, el proyecto cuenta con la participación de 10 centros así como de un biobanco que colecciona las muestras biológicas de los pacientes que se incluyen en la cohorte. Los centros participantes en el estudio, así como sus características se pueden ver en la Tabla 1.

El inicio de reclutamiento de pacientes fue en Junio de 2013, momento en que el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del centro coordinador del estudio aprobó oficialmente el proyecto, si bien cada centro empezó

el reclutamiento en función de la fecha de aprobación de su propio CEIC (Tabla 1). Los pacientes que se incluyen en la cohorte multicéntrica deben cumplir los siguientes criterios: ser mayor de 18 años, tener un diagnóstico de trastorno por uso de alcohol según criterios del DSMV (American Psychiatric Association, 2013) y firmar un consentimiento informado para la cesión de datos y muestras biológicas.

### Aspectos éticos

Cada centro participante ha gestionado con su respectivo CEIC la aprobación del protocolo del estudio y el consentimiento informado que se administra a los pacientes en la primera visita. El consentimiento informado para la utilización de datos clínicos y muestras biológicas fue diseñado junto con miembros del Biobanco de la RTA situado en la Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante y ha sido aprobado por cada uno de los CEIC de los centros participantes.

Además, el proyecto cuenta con el reconocimiento de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios como Estudio Observacional no Postautorización (No-EPA).

Los pacientes que firman el consentimiento informado lo hacen bajo la premisa de que la información que proporcionan es anónima y de que pueden revocar su consentimiento en cualquier momento, de conformidad con la Ley Española de Protección de Datos. En el consentimiento informado también se contempla la opción de que el paciente pueda ceder únicamente datos clínicos.

Tabla 1. Centros participantes en el estudio CohRTA, Programa Alcohol, Red de Trastornos Adictivos-RTA a Diciembre de 2015.

Centro	Ciudad	Tipo de recurso asistencial	Perfil	Vinculación	Código CEIC
Hospital Univ. Germans Trias i Pujol*	Badalona	Unidad de Adicciones	Medicina Interna	RETICS / PNSD	PI-13-031
Hospital del Mar	Barcelona	Unidad de Adicciones	Psiquiatría	RETICS	2013/5313/I
Hospital Clínic de Barcelona	Barcelona	Unidad de Alcoholología	Psiquiatría	RETICS	2013/8738
Hospital Universitari de Bellvitge	L'Hospitalet de Llobregat	Unidad de Adicciones	Medicina Interna	PNSD	PR049/14
Hospital Clínico Universitario	Salamanca	Servicio de Medicina Interna	Medicina Interna	RETICS	E.O. 13/337
Hospital 12 de Octubre	Madrid	Servicio de Psiquiatría	Psiquiatría	RETICS	15/065
Universidad de Valladolid	Valladolid	Alcohólicos Rehabilitados de Valladolid (ARVA)	Atención primaria	RETICS	PI13-120
Hospital Universitari Son Espases	Palma de Mallorca	Unidad de Problemas Relacionados con el Alcohol (UPRA)	Medicina Interna	PNSD	IB 2357/14 PI
Hospital Lucus Augusti	Lugo	Servicio de Medicina Interna	Medicina Interna	PNSD	2015/010
Centro Delta	Badalona	Centro Municipal de Atención a las Drogodependencias	Atención primaria	PNSD	PI-13-031
Universidad Miguel Hernández	San Juan de Alicante	Biobanco		RETICS	

Nota. \*Centro coordinador



Pacientes con trastorno por uso de alcohol: resultados iniciales de un registro multicéntrico en la Red de Trastornos Adictivos-RTA. Estudio CohRTA

### Información registrada

Se han diseñado dos cuestionarios estructurados, uno para la entrada del paciente en el estudio de cohorte y otro para las visitas de seguimiento.

En el cuestionario basal se incluyen variables sociodemográficas, antecedentes familiares, variables del consumo de alcohol y de sustancias de abuso y variables clínicas, analíticas y del tratamiento del trastorno.

Para evaluar la comorbilidad médica de los pacientes que entran en el estudio se utiliza el índice Cumulative Illness Rating Scale-Substance Abuse (CIRS-SA) (Castillo et al., 2004). Se trata de una herramienta que analiza la presencia o ausencia de enfermedad en 13 órganos o sistemas: 1) Cardíaco, 2) Vascular, 3) Respiratorio, 4) Ojos, oídos, nariz, garganta y laringe, 5) Gastrointestinal alto, 6) Gastrointestinal bajo, 7) Hígado, 8) Renal, 9) Genitourinario, 10) Músculo-esquelético, 11) Neurológico, 12) Infecciones, endocrinología, metabólico, 13) Infección por VIH.

Además, cada órgano o sistema recibe una puntuación entre 0 y 4 según la severidad de la afectación: 0, ausencia de afectación; 1, afectación leve (problema leve actual o antecedente de problema significativo); 2, afectación moderada (discapacidad moderada o morbilidad que requiere tratamiento de primera línea); 3, afectación severa (discapacidad severa/constante o problemas crónicos incontrolables); 4, afectación muy severa (extremadamente grave/requiere tratamiento inmediato/insuficiencia orgánica/deterioro severo de la función).

Para evaluar la comorbilidad psiquiátrica, el estudio CohRTA realiza un cribaje de depresión, psicosis, trastorno de atención e hipereactividad, estrés postraumático, ansiedad generalizada, pánico, fobia social y manía.

Un resumen detallado de estas variables se puede ver en la Tabla 2.

El cuestionario de seguimiento de los casos incluye datos sobre el consumo de alcohol posterior al primer tratamiento, además de incorporar la aparición de eventos clínicos y muerte.

Además, se ha previsto la opción de añadir al protocolo inicial del estudio una serie de módulos específicos para estudios adicionales; entre ellos, el cuestionario PRISM (Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorder) ya se ha empezado utilizar en algunos centros. Otros como la valoración de la ideación suicida, uso de servicios de salud o calidad de vida están por determinar. Además, por ahora se ha implementado un módulo que contiene el cuestionario de salud general SF-12.

El cuestionario SF-12, consta de 12 preguntas que proporcionan una medida subjetiva del estado de salud. Evalúa ocho aspectos: estado físico, limitaciones por problemas físicos de salud, funcionamiento social, dolor corporal, salud mental, limitaciones por problemas personales o emocionales, vitalidad y salud general. Se trata de una versión reducida del cuestionario SF-36 que ha sido validada en

Tabla 2. Variables de estudio en los pacientes filiados en el estudio CohRTA, Programa Alcohol, Red de Trastornos Adictivos-RTA.

Filiación	Identificadores paciente Fecha de nacimiento Sexo Fecha de inclusión Recogida de muestras biológicas y fecha
Sociodemográficas	Estado civil Situación socioeconómica y laboral Nivel de estudios
Diagnóstico	Severidad del trastorno por uso de alcohol según DSMV
Consumo alcohol	Historia de consumo Patrón consumo actual* (cantidad y frecuencia) Tiempo de abstinencia Intoxicaciones etílicas Antecedentes familiares
Consumo otras sustancias	Tabaco (historia de consumo, patrón consumo actual) Cocaína (historia de consumo, patrón consumo actual) Cannabis (patrón consumo actual) Anfetaminas (patrón consumo actual) Alucinógenos (patrón consumo actual) Opiáceos (patrón consumo actual) Inhalantes (patrón consumo actual) Drogas emergentes (patrón consumo actual) Drogas por vía intravenosa (historia de consumo, consumo actual)
Analítica general	Hemograma (10 parámetros) Bioquímica (28 parámetros) Estudio de anemias (8 parámetros) Serologías víricas (10 parámetros) Drogas de abuso en orina (opiáceos, cocaína, cannabis, anfetaminas)
Comorbilidad	Orgánica según índice CIRS-SA** Psiquiátrica según cribaje distintas patologías
Tratamiento	Farmacológico (fármaco, fecha inicio y final, dosis prescrita) Intervenciones terapéuticas no farmacológicas (tipo y fecha)

Nota. \*Se considera consumo actual el realizado los últimos 30 días;  
\*\*Cumulative Illness Rating Scale-Substance Abuse.

distintas poblaciones y países y que es sensible a cambios terapéuticos (Gandek et al., 1998; Salyers, Bosworth, Swanson, Lamb-Pagone, y Osher, 2000).

### Proceso de recogida de datos

Cada centro participante tiene asignada una persona encargada de la recogida de datos de los pacientes en estudio. El almacenaje de la información y las actualizaciones periódicas se hacen mediante una plataforma diseñada para dicho fin (Coresfot Clínico, www.coresoft.es) por profesionales dedicados al desarrollo, mantenimiento y soporte de registros clínicos online que cumple con la Ley Orgánica de Protección de Datos, así como con las leyes vigentes sobre seguridad y confidencialidad. La implementación del aplicativo para la introducción de datos se ha

Arantza Sanvisens, Paola Zuluaga, Inmaculada Rivas, Gabriel Rubio, Antoni Gual, Marta Torrens, Antoni Short, Francisco Javier Álvarez, Jordi Tor, Magí Farré, Fernando Rodríguez de Fonseca, Roberto Muga y CohRTA.

hecho en dos fases: una primera fase (septiembre 2014) en la que estaban disponibles los módulos de información referentes a las variables sociodemográficas y de consumo de drogas y en la cual únicamente tenían acceso los grupos pertenecientes a la RTA y una segunda fase (septiembre 2015) en la que se implementaron los módulos clínicos y en la que se abrió el acceso a la plataforma a aquellos grupos clínicos incluidos en la ayuda adicional del PNSD.

#### **Biobanco**

Los centros participantes en el estudio CohRTA disponen de un biobanco de referencia para la recepción y almacenamiento de muestras biológicas. Cada muestra debe estar identificada con el código del paciente, de forma que permita su conexión con la base de datos clínicos. Para la recogida de muestras biológicas se extraen 10 mL de sangre que será procesada para obtener ADN.

El biobanco del proyecto CohRTA está situado en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, en San Juan de Alicante. El biobanco dispone de un comité científico formado por el coordinador de la RTA, un responsable local e investigadores de la red. El sistema de gestión del biobanco cumple con la normativa internacional UNE-EN-ISO 9001:2008 (Nº Registro ER-0614/2010).

Según la normativa vigente, las muestras biológicas pueden cederse a proyectos de investigación vinculados a la RTA y relacionados con el trastorno por uso de alcohol, previa autorización de un Comité de Ética.

#### **Criterios de autoría**

El proyecto CohRTA dispone de un documento con los criterios que se seguirán para la autoría científica de los trabajos que se deriven del proyecto. Estos criterios se basan en establecer un orden de autorías en la cabecera de los artículos científicos y comunicaciones a congresos y en determinar el contenido del Apéndice que recoge los distintos participantes y centros de investigación. Se establecen criterios de autorías distintos en función del grado de participación, utilización de muestras y/o datos clínicos o de si los trabajos han sido desarrollados por miembros del proyecto CohRTA o por otros investigadores preclínicos de la RTA que pudieran utilizar muestras biológicas de pacientes incluidos en CohRTA.

#### **Análisis de datos**

Se extrajeron del aplicativo las variables sociodemográficas y de consumo de alcohol y otras drogas de todos los pacientes registrados entre junio 2013 y noviembre 2015. Se realizó un análisis descriptivo de los datos en el cual las variables continuas se describieron mediante la mediana y el rango intercuartílico (RIQ) y las variables categóricas mediante las frecuencias relativas. El análisis estadístico fue realizado con SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

#### **Resultados**

Entre junio de 2013 y noviembre de 2015 se filiaron 344 pacientes, 264 (76.7%) hombres, con una mediana de edad de 50 años (RIQ:43-55 años). La edad de inicio de consumo de alcohol fue 15 años (RIQ:14-18 años) y un 61% referían antecedente familiar de trastorno por uso de alcohol. Durante los 30 días previos al inicio de tratamiento, los pacientes bebían una mediana de 12.5 UBE/día (RIQ:7.1-20 UBE/día), un 72% eran fumadores de tabaco y un 29.7% consumían cocaína. Los datos sociodemográficos y los relacionados con la historia de consumo de alcohol y otras sustancias se muestran en la Tabla 3.

De los pacientes incluidos en el proyecto CohRTA se dispone actualmente de 76 muestras para el estudio del ADN. El hecho de que el estudio esté asociado a un repositorio de muestras biológicas dará lugar a un número de proyectos en los que grupos preclínicos con experiencia en modelos animales trasladen sus hipótesis a la investigación en humanos.

Dado el potencial de información clínica y biológica que se puede recoger mediante este estudio, puede servir de plataforma para la formación de nuevos investigadores clínicos en España y la elaboración de tesis doctorales. La incorporación de distintos centros y la implicación de grupos clínicos asistenciales en entornos científicos pueden potenciar la investigación al disponer de métodos adecuados para responder a retos del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Además, el sistema nacional de salud y la política científica de RETICS apoyan este tipo de proyectos basados en estructuras nacionales de investigación y centrados en el paciente. Programas de formación en investigación del ISCIII como Rio Hortega o Juan Rodés están orientados a mejorar las habilidades investigadoras de jóvenes facultativos.

En definitiva, con una cohorte de pacientes bien establecida se espera aumentar la cantidad y calidad científica en relación a las complicaciones del trastorno por uso de alcohol y sus consecuencias clínicas y sociales en España.

#### **Discusión**

La demanda de tratamiento del trastorno por uso de alcohol en España ha aumentado. El perfil de los pacientes que solicitan tratamiento del trastorno es el de adultos de mediana edad, mayoritariamente hombres y que pueden ser consumidores de cocaína y de cannabis. Este perfil es similar al descrito en pacientes con trastorno por uso de alcohol o consumo de alcohol de riesgo a los que se les realiza una intervención breve en salas de urgencias, atención primaria u hospitalizados por otras causas (Heather, 2014; Mdege et al., 2013; Nilsen et al., 2008). Los resultados que se muestran en este estudio revelan la severidad del trastorno en aquellos que solicitan tratamiento por primera vez y confirman que éste se produce, en promedio, casi 30 años

Pacientes con trastorno por uso de alcohol: resultados iniciales de un registro multicéntrico en la Red de Trastornos Adictivos-RTA. Estudio CohRTA

Tabla 3. Características sociodemográficas y del consumo de alcohol y otras sustancias en 344 pacientes con trastorno por uso de alcohol que solicitan tratamiento por primera vez. Programa Alcohol, Red de Trastornos Adictivos-RTA.

	N=344 n (%)
<b>Sociodemográficas</b>	
Hombres	264 (76.7)
Edad, mediana [RIQ]	50 [43-55]
Españoles	324 (94.2)
Estado civil (n=335)	
Soltero/a	89 (26.6)
Casado/a – Pareja de Hecho	138 (41.2)
Viudo/a	11 (3.3)
Separado/a – Divorciado/a	97 (28.9)
Situación laboral (n=337)	
Trabajando	152 (45.1)
Parado	104 (30.9)
Incapacidad permanente / pensionista	69 (20.5)
Otras situaciones	12 (3.6)
<b>Consumo de alcohol y otras drogas</b>	
Severidad del trastorno por uso de alcohol según DSM-V (n=340)	
2-5	62 (18.2)
6-8	169 (49.7)
9-11	109 (32.1)
Edad inicio consumo alcohol, mediana [RIQ]	15 [14-18]
Edad inicio del consumo regular alcohol, mediana [RIQ]	22 [18-30]
UBE /día, últimos 30 días, mediana [RIQ]	12.5 [7.1-20]
Tiempo total abstinencia al alcohol (años), mediana [RIQ]	1 [0-3]
Antecedente familiar de trastorno por uso de alcohol (n=334)	
	203 (60.8)
Número de intoxicaciones etílicas con atención médica a lo largo de la vida (n=321)	
Ninguna	147 (45.8)
1-5	162 (50.5)
>5	12 (3.7)
Tabaco (n=341)	
Si	245 (71.8)
No	62 (18.2)
Exfumador	34 (10.0)
Consumo en los últimos 30 días de:	
Cocaína	33 (29.7)
Cannabis/marihuana	78 (22.9)
Anfetaminas	9 (2.6)
Tranquilizantes o benzodicepinas sin prescripción médica	20 (5.9)
Opiáceos sin prescripción médica	4 (1.2)
Consumo de drogas por vía parenteral alguna vez en la vida	12 (3.5)

después de iniciar el consumo de alcohol. Una revisión sistemática reciente del trastorno indica que el primer episodio de tratamiento es tardío y se produce cuando está clínicamente establecido (Connor, Haber y Hall, 2016). Por otro lado, observamos que dos de cada tres pacientes tenían antecedentes familiares de trastorno por uso de alcohol que, de hecho, es uno de los factores de riesgo ya descritos para esta enfermedad (Connor et al., 2016).

Debido a la escasez de estudios multicéntricos españoles en esta patología, el proyecto de investigación aquí presen-

tado permitirá conocer la dimensión clínica del problema, su tratamiento y en definitiva actualizará el pronóstico de la enfermedad. Además, el estudio aportará conocimiento en el abuso de alcohol en la mujer y sus secuelas a largo plazo, hasta ahora no bien delimitadas; las mujeres con trastorno por uso de alcohol representan sólo un 20% del total y se requiere de un amplio reclutamiento de casos para obtener una muestra representativa. Por otra parte, los resultados obtenidos en este proyecto podrán ser de utilidad para plantear nuevas estrategias diagnósticas del trastorno.

La capacidad de investigación y de transferencia del conocimiento es clave en proyectos multicéntricos. El trabajo en red es una oportunidad para dar proyección a la investigación centrada en el paciente. Las ventajas de la integración de grupos clínicos y básicos con intereses afines son innumerables y el proyecto CohRTA puede ser una plataforma adecuada para adaptarse a la investigación del futuro.

Los estudios de cohorte han supuesto un cambio radical en el conocimiento de algunas enfermedades. Solo a modo de ejemplo, buena parte del conocimiento actual en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares se debe al estudio Framingham (EE.UU), una cohorte prospectiva que se empezó a reclutar en 1948 para establecer los hoy en día más que reconocidos factores de riesgo cardiovascular (McKee, Castelli, McNamara, y Kannel, 1971). Años después el modelo de investigación longitudinal en esta enfermedad se implantó en nuestra sociedad (Nascetti et al., 2001) como también ha ocurrido en otras como el VIH/Sida (Sobrinho-Vegas et al., 2011) y la enfermedad tromboembólica (Nieto y Monreal, 2004); todas ellas han incrementado de forma notable el conocimiento a través de una producción científica excelente en sus respectivas áreas de conocimiento.

En el caso del trastorno por uso de alcohol y de la adicción a las drogas, son varios los estudios de cohorte que se han desarrollado en nuestro entorno. Cabe citar, por ejemplo, la cohorte de 850 pacientes que solicitaron tratamiento por abuso de alcohol a finales de los años ochenta (Gual, Lligona, y Colom, 1999; Gual, Lligoña, Costa, Segura, y Colom, 2004), la cohorte Itinere que incluye pacientes usuarios de heroína y cocaína (Pulido et al., 2009) o la de cerca de 6.000 pacientes ingresados en unidades hospitalarias de desintoxicación de Barcelona y área metropolitana, 1.200 de los cuales por dependencia del alcohol (Rivas et al., 2013; Sanvisens et al., 2014).

El proyecto CohRTA está específicamente diseñado para analizar pacientes con trastorno por uso de alcohol desde el momento que solicitan tratamiento del trastorno por primera vez; el estudio está anidado en centros de primera línea asistencial, es rico en datos clínicos y biológicos, está orientado al paciente y se centra en conocer el impacto del alcoholismo a medio y largo plazo. No obstante, este tipo de estudios presenta varias limitaciones la principal de las cuales deriva de su carácter longitudinal. Los estudios

Arantza Sanvisens, Paola Zuluaga, Inmaculada Rivas, Gabriel Rubio, Antoni Gual, Marta Torrens, Antoni Short, Francisco Javier Álvarez, Jordi Tor, Magí Farré, Fernando Rodríguez de Fonseca, Roberto Muga y CohRTA.

longitudinales son costosos, requieren especial dedicación para el seguimiento de todos los casos durante un largo periodo de tiempo y personal cualificado para la actualización de datos y análisis estadístico. Por otro lado, el carácter multicéntrico de este estudio puede tener un cierto sesgo interobservador para determinadas variables que requieren de interpretación (ej. comorbilidad clínica y psiquiátrica) si bien este aspecto se ha procurado minimizar mediante la elaboración de guías ampliamente detalladas para la recogida de datos.

Sin embargo, el nivel científico de los grupos participantes en CohRTA ya sea en el tratamiento del trastorno (Gual y Miquel, 2015; López-Pelayo et al., 2014), neuroinflamación y daño cerebral (Montesinos et al., 2015; Pascual, Ballejo, Aragón, y Guerrí, 2015), inmunidad y genética asociada a la hepatopatía alcohólica (Chamorro et al., 2014; Novo-Veleiro et al., 2014), comorbilidad y mortalidad (Rivas et al., 2013; Sanvisens et al., 2014) o dimensión del problema desde la Salud Pública (Bosque-Prous et al., 2014; Villalbí, Bosque-Prous, Gili-Miner, Espelt, y Brugal, 2014) garantizan la viabilidad del proyecto.

### Agradecimientos

El Proyecto CohRTA está parcialmente financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (RETICS RD12/0028 y RD16/0017), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por el Plan nacional Sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. (PNSD 2014|042, PNSD 2015| 027 y PNSD 2015|054). Esther Papaseit está adscrita al programa Joan Rodés del Instituto de Salud Carlos III (JR16/00020). Fulbright Scholar Program - Ministerio de Educación (PRX16/00147).

### Apéndice

Red de Trastornos Adictivos-RTA, Coordinación del Programa Alcohol; Fernando Rodríguez de Fonseca, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Málaga.

Proyecto CohRTA, Comité ejecutivo: Antoni Gual, Francisco Javier Laso, Marta Torrens, Fernando Rodríguez de Fonseca, Robert Muga.

Proyecto CohRTA, Centro Coordinador: Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

Proyecto CohRTA, Centros participantes e investigadores del estudio a 31 de Diciembre de 2015: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona: Paola Zuluaga, Daniel Fuster, Jordi Tor, Robert Muga, Magí Farré, Arantza Sanvisens, Esther Papaseit; Hospital Clínic, Barcelona: Antoni Gual, Laia de Miquel; Parc de Salut Mar, Barcelona: Marta Torrens, Francina Fonseca, Gabriel Vallecillo, Alvaro Palma; Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de

Llobregat: Ferran Bolao; Hospital Clínic Universitario, Salamanca: Francisco Javier Laso, Miguel Marcos; Hospital 12 de Octubre, Madrid: Gabriel Rubio, Núria García-Marchena; Hospital Clínic Universitario de Valladolid-Alcohólicos Rehabilitados de Valladolid (ARVA), Valladolid: Javier Álvarez, Trinidad Gómez-Talegón; Hospital Lucus Augusti, Lugo: Rafael Monte; Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca: Antoni Short, Catalina Moranta, Rafael Blanes; Centro de Atención a las Drogodependencias-Centro Delta, Badalona: Eva Faure, Néstor Espinach, Inmaculada Rivas.

Biobanco: Luis Navarro, Carmen de Felipe; Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante.

### Conflictos de interés

No existen conflictos de interés.

### Referencias

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C. y Corrao, G. (2001). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Research & Health*, 25, 263–270.
- Bosque-Prous, M., Espelt, A., Guitart, A. M., Bartoli, M., Villalbí, J. R. y Brugal, M. T. (2014). Association between stricter alcohol advertising regulations and lower hazardous drinking across European countries. *Addiction*, 109, 1634–1643. doi: 10.1111/add.12562.
- Castillo, C., Bulbena, A., Serras, E., Torrens, M., López-Colomé, J. L., Martínez, M. A. y Politínska, B. (2004). Medical assessment in drug addicts: reliability and validity of the Cumulative Illness Rating Scale (Substance Abuse version). *European Addiction Research*, 10, 112–117. doi: 10.1159/000077699.
- Chamorro, A. J., Torres, J. L., Mirón-Canelo, J. A., González-Sarmiento, R., Laso, F. J. y Marcos, M. (2014). Systematic review with meta-analysis: the I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40, 571–581. doi: 10.1111/apt.12890.
- Connor, J. P., Haber, P. S. y Hall, W. D. (2016). Alcohol use disorders. *Lancet*, 387, 988–998. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00122-1
- Fuster, D., Sanvisens, A., Bolao, F., Serra, I., Rivas, I., Tor, J. y Muga, R. (2015). Impact of hepatitis C virus infection on the risk of death of alcohol-dependent patients. *Journal of Viral Hepatitis*, 22, 18–24. doi: 10.1111/jvh.12290.
- Gandek, B., Ware, J. E., Aaronson, N. K., Apolone, G., Bjorner, J. B., Brazier, J. E.,... Sullivan, M. (1998). Cross-vali-

Pacientes con trastorno por uso de alcohol: resultados iniciales de un registro multicéntrico en la Red de Trastornos Adictivos-RTA. Estudio CohRTA

- dation of item selection and scoring for the SF-12 Health Survey in nine countries: results from the IQOLA Project. *International Quality of Life Assessment. Journal of Clinical Epidemiology*, 51, 1171–1178.
- Gossop, M., Manning, V. y Ridge, G. (2006). Concurrent use and order of use of cocaine and alcohol: behavioural differences between users of crack cocaine and cocaine powder. *Addiction*, 101, 1292–1298. doi: 10.1111/j.1360-0443.2006.01497.x.
- Gual, A., Lligona, A. y Colom, J. (1999). Five-year outcome in alcohol dependence. A naturalistic study of 850 patients in Catalonia. *Alcohol and Alcoholism*, 34, 183–192.
- Gual, A., Lligona, A., Costa, S., Segura, L. y Colom, J. (2004). Tratamiento del alcoholismo y su impacto a largo plazo. Resultados a 10 años de un estudio longitudinal prospectivo de 850 pacientes. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 123, 364–369.
- Gual, A. y Miquel, L. (2015). Nuevas perspectivas para el tratamiento del alcoholismo. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 144, 24–25. doi: 10.1016/j.medcli.2014.07.020.
- Heather, N. (2014). The two forms of alcohol brief intervention: an uneasy coalition. *Addiction*, 109, 1059–1060. doi: 10.1111/add.12443.
- López-Pelayo, H., Wallace, P., Segura, L., Miquel, L., Díaz, E., Teixidó, L.,... Gual, A. (2014). A randomised controlled non-inferiority trial of primary care-based facilitated access to an alcohol reduction website (EFAR Spain): the study protocol. *BMJ Open*, 4, e007130. doi: 10.1136/bmjopen-2014-007130.
- McKee, P. A., Castelli, W. P., McNamara, P. M. y Kannel, W. B. (1971). The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *The New England Journal of Medicine*, 285, 1441–1446. doi: 10.1056/NEJM197112232852601.
- Mdege, N. D., Fayer, D., Watson, J. M., Stirk, L., Sowden, A. y Godfrey C. (2013). Interventions for reducing alcohol consumption among general hospital inpatient heavy alcohol users: a systematic review. *Drug and Alcohol Dependence*, 131, 1–22. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.01.023.
- Montesinos, J., Pascual, M., Pla, A., Maldonado, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J. y Guerri, C. (2015). TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain, Behavior and Immunity*, 45, 233–244. doi: 10.1016/j.bbi.2014.11.015.
- Naimi, T. S., Brewer, R. D., Mokdad, A., Denny, C., Serdula, M. K. y Marks, J. S. (2003). Binge drinking among US adults. *JAMA*, 289, 70–75.
- Nascetti, S., Elosua, R., Pena, A., Covas, M. I., Senti, M. y Marrugat, J. (2001). Variables associated with fibrinogen in a population-based study: interaction between smoking and age on fibrinogen concentration. *European Journal of Epidemiology*, 17, 953–958.
- Nieto, J. A. y Monreal, M. (2004). Recurrent venous thromboembolism in men and women. *The New England Journal of Medicine*, 351, 2015–2018.
- Nilsen, P., Baird, J., Mello, M. J., Nirenberg, T., Woolard, R., Bendtsen, P. y Longabaugh, R. (2008). A systematic review of emergency care brief alcohol interventions for injury patients. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 35, 184–201. doi:10.1016/j.jsat.2007.09.008.
- Novo-Veleiro, I., González-Sarmiento, R., Cieza-Borrella, C., Pastor, I., Laso, F. J. y Marcos, M. (2014). A genetic variant in the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to alcohol use disorders. *European Psychiatry*, 29, 288–292. doi: 10.1016/j.eurpsy.2014.02.002.
- Observatorio Español sobre Drogas, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. (2011). *Informe 2011. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España*. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.
- Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C. M. G. y Guerri, C. (2015). Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*, 89, 352–359. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.014.
- Pennings, E. J. M., Leccese, A. P. y de Wolff, F. A. (2002). Effects of concurrent use of alcohol and cocaine. *Addiction*, 97, 773–783.
- Pons, J. M. V., Rodés, J., Andreu, A. y Arenas, J. (2013). La olvidada investigación clínica. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 140, 325–331. doi: 10.1016/j.medcli.2012.10.011.
- Pulido, J., Brugal, M. T., de la Fuente, L., Ballesta, R., Barrio, G., Bravo, M. J.,... Fernández, F. (2009). Metodología de reclutamiento y características de una cohorte de jóvenes consumidores habituales de cocaína de tres ciudades españolas. *Gaceta Sanitaria*, 23, 200–207. doi: 10.1016/j.gaceta.2008.05.003.
- Rivas, I., Sanvisens, A., Bolao, F., Fuster, D., Tor, J., Pujol, R.,... Muga, R. (2013). Impact of medical comorbidity and risk of death in 680 patients with alcohol use disorders. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 37 Suppl 1, E221–E227. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01861.x.
- Roerecke, M. y Rehm, J. (2013). Alcohol use disorders and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Addiction*, 108, 1562–1578. doi: 10.1111/add.12231.
- Salyers, M. P., Bosworth, H. B., Swanson, J. W., Lamb-Pagone, J. y Osher, F. C. (2000). Reliability and validity of the SF-12 health survey among people with severe mental illness. *Medical Care*, 38, 1141–1150.
- Sanvisens, A., Vallecillo, G., Bolao, F., Rivas, I., Fonseca, F., Fuster, D.,... Muga, R. (2014). Temporal trends in the survival of drug and alcohol abusers according to the primary drug of admission to treatment in Spain. *Drug and Alcohol Dependence*, 136, 115–120. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.12.022.

Arantza Sanvisens, Paola Zuluaga, Inmaculada Rivas, Gabriel Rubio, Antoni Gual, Marta Torrens, Antoni Short, Francisco Javier Álvarez, Jordi Tor, Magí Farré, Fernando Rodríguez de Fonseca, Roberto Muga y CohRTA.

- Sobrinó-Vegas, P., Gutiérrez, F., Berenguer, J., Labarga, P., García, F., Alejos-Ferreras, B.,... del Amo, J. (2011). La cohorte de la red española de investigación en Sida y su biobanco: organización, principales resultados y pérdidas de seguimiento . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 645–653.doi: 10.1016/j.eimc.2011.06.002.
- Thomas, D. L., Astemborski, J., Rai, R. M., Anania, F. A., Schaeffer, M., Galai, N.,... Vlahov, D. (2000). The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*, 284, 450–456.
- Villalbí, J. R., Bosque-Prous, M., Gili-Miner, M., Espelt, A. y Brugal, M. T. (2014). Políticas para prevenir los daños causados por el alcohol. *Revista Española de Salud Pública*, 88, 515–528.doi: 10.4321/S1135-57272014000400006.
- World Health Organization. (2010). *Global Status Report on Alcohol*. Ginebra: World Health Organization.

## Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón

### *Hepatitis C associated to substance abuse: ever closer to a treatment without Interferon*

ROBERTO MUGA\*, PAOLA ZULUAGA\*, ARANTZA SANVISENS\*, INMACULADA RIVAS\*\*, DANIEL FUSTER\*, FERRAN BOLAO\*\*\*, JORDI TOR\*, RED DE TRASTORNOS ADICTIVOS-RTA

\* Servei de Medicina Interna. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona.  
 \*\* Centro de Atención y Seguimiento de las drogodependencias (CAS DELTA) y Bus Intermunicipal de Metadona (BIM). Institut Municipal de Serveis Personals, Badalona. \*\*\* Servei de Medicina Interna. Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat.

#### Resumen

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de Salud Pública de primera magnitud; cada año ocurren entre 3 y 4 millones de nuevas infecciones y de hecho, la hepatitis crónica C es una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo. Usar drogas por vía parenteral está en el origen de dos de cada tres nuevas infecciones por VHC en el mundo occidental.

El tratamiento de la hepatitis C va a cambiar en los próximos años. El cambio es debido a la aparición de los llamados Antivirales de Acción Directa (AAD), unos fármacos que actúan contra proteínas clave del ciclo vital del VHC y que serán más eficaces, mejor tolerados y se administrarán durante menos tiempo. En este sentido, la nueva guía de tratamiento de la OMS en 2014 ya incluye alguno de ellos en sus recomendaciones; los nuevos fármacos se utilizarán en combinación y probablemente se podrá prescindir del Interferón.

Con la aparición de más y mejores antivirales contra el VHC es probable que debamos revisar el modelo asistencial vigente y orientarlo hacia uno más ágil e integrador, que trate al mayor número posible de pacientes, incluyendo a aquellos con abuso de sustancias.

*Palabras clave:* abuso de sustancias; hepatitis C; tratamiento; antivirales acción directa.

#### Abstract

With 3-4 million of new infections occurring annually, hepatitis C virus (HCV) infection is a global Public Health problem. In fact, hepatitis C virus infection is one of the leading causes of liver disease in the world; in Western countries, two thirds of the new HCV infections are associated with injection drug use.

The treatment of hepatitis C will change in the coming years with the irruption of new anti-HCV drugs, the so called Direct Antiviral Agents (DAA) that attack key proteins of the HCV life cycle. The new antiviral drugs are effective, safer and better tolerated. In this sense, the 2014 WHO HCV treatment guidelines include some of them. The new DAA are used in combination and it is expected that Interferon will be not necessary in future treatment regimens against HCV infection.

The irruption of new and potent antivirals can make necessary the review of the current standards of care in the HCV infected population. More inclusive and proactive treatment policies will be necessary in those individuals with substance use disorders.

*Key words:* substance abuse; hepatitis C; treatment; direct antiviral action.

*Recibido: Abril 2014; Aceptado: Noviembre 2014*

#### Enviar correspondencia a:

Dr. Roberto Muga. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. 08916 Badalona.  
 Email: rmuga.germanstrias@gencat.cat

ADICCIONES, 2015 · VOL. 27 NÚM. 2 · PÁGS. 128-136

128

Roberto Muga, Paola Zuluaga, Arantza Sanvisens, Inmaculada Rivas, Daniel Fuster, Ferran Bolao, Jordi Tor, Red de Trastornos Adictivos-RTA

**E**l tratamiento de la hepatitis crónica C va a cambiar en los próximos años. El cambio es debido a la aparición de fármacos más eficaces, mejor tolerados, que apenas generan resistencias farmacológicas y que se administrarán durante menos tiempo. Estudios publicados a partir de 2012 muestran la eficacia de algunos de estos fármacos y si ello es así, se pondrá de manifiesto la necesidad de expandir el tratamiento a un mayor número de pacientes; por lo tanto, detección de la infección y evaluación de la hepatopatía serán relevantes si se confirma que la curación de la infección puede ser superior al 90%, independientemente del genotipo viral o de haber fracasado en tratamientos anteriores. Cuando la eficacia de las nuevas terapias se confirme en los ensayos clínicos, el tratamiento de la enfermedad se generalizará y tiempo después se demostrará su efectividad poblacional; eficacia clínica y efectividad poblacional son conceptos diferentes; se necesita de ésta última para reducir la enorme carga de enfermedad que provoca el virus de la hepatitis C (VHC) en la sociedad. ¿Qué tiene que ver todo esto con los usuarios de drogas? Mucho. En el mundo occidental, dos de cada tres nuevas infecciones por VHC se dan en personas que han utilizado o utilizan drogas por vía parenteral, pero esta población es, no por casualidad, la que menos se trata de la hepatitis C. Los motivos para no recibir el tratamiento de la hepatitis C en personas con historia de abuso de sustancias son muy diversos y se describen en esta revisión, pero uno de los más invocados es la mala tolerancia al Interferón, un fármaco inmunomodulador que forma parte de la columna vertebral del tratamiento de la hepatitis C desde hace dos décadas. Por otra parte, si se confirman las ventajas de los nuevos fármacos, los pacientes con infección por VHC asociada al consumo de sustancias querrán tratarse, como ya ocurrió tras la irrupción de los fármacos antirretrovirales de gran eficacia frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### Epidemiología de la hepatitis C

La infección por VHC es una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo (Shepard, Finelli, y Alter, 2005). La prevalencia de la infección en la población mundial, aunque con marcadas diferencias geográficas, es cercana al 3% lo que equivale a 185 millones de personas afectadas. Se estima que 10 millones de las personas con infección por VHC son, o han sido, usuarios de drogas por vía parenteral (UDIs) (Nelson et al., 2011; Mohd Hanafiah, Groeger, Flaxman, y Wiersma, 2013).

Globalmente, la prevalencia de la infección es mayor en hombres, en el grupo de edad comprendido entre 30 y 49 años y en niveles socioeconómicos bajos (Alter, 2007). Los factores de riesgo de infección varían, aunque las transfusiones de sangre y/o hemoderivados antes de 1992, la utilización de material sanitario no desechable y el uso de drogas por vía parenteral siguen siendo los más importantes

(Des Jarlais et al., 2003; Memon y Memon, 2002). En EE.UU hay más de 2 millones de personas que usan drogas por vía parenteral y la incidencia de infección por VHC se estima entre el 8% y 25% anual entre los más jóvenes; en EE.UU cada año se diagnostican 30.000 nuevas infecciones y la incidencia de la infección es mayor en los nuevos consumidores de drogas y durante el primer año de consumo (Nelson et al., 2011; Page et al., 2009). Está demostrado que la transmisión del VHC es 10 a 15 veces superior a la del VIH (Page et al., 2009; Page, Morris, Hahn, Maher, y Prins, 2013), lo que indica la fácil transmisión de la infección en esta población.

Por otro lado, las personas con trastorno por uso de alcohol presentan mayor prevalencia de infección por el VHC que la población general. Hasta el 20% de una serie de 700 pacientes que solicitan tratamiento de alcoholismo en el área de Barcelona se hallan infectados por el VHC según un estudio reciente (Rivas et al., 2013).

El VHC es la principal causa de trasplante hepático y de carcinoma hepatocelular (CHC) en países occidentales (Fremman et al., 2008; Yang et al., 2011). De hecho, CHC y cirrosis hepática han aumentado en los últimos años entre las personas infectadas por el VHC, y se prevé que ambas enfermedades aumenten significativamente en las próximas décadas (Mehta et al., 2010; Rein et al., 2011). Un estudio en EE.UU pone de manifiesto el número creciente de muertes en personas infectadas por VHC, que ya supera las atribuidas al VIH/Sida (Ly et al., 2012); el mismo estudio indica que las muertes relacionadas con el VHC se producen mayoritariamente en el grupo de edad comprendido entre 45 y 64 años (Ly et al., 2012), lo que ha llevado a las autoridades sanitarias de aquel país a aconsejar que la población general de esa edad se realice una prueba diagnóstica del VHC. Se ha estimado además, que un millón de personas con infección por el VHC morirán en EE.UU por las complicaciones relacionadas la enfermedad si no reciben tratamiento (Rein et al., 2011, 2012).

En España, se estima que el número de personas con infección por el VHC es de alrededor de 430.000, siendo los mayores de 50 años los que muestran mayor prevalencia de infección; en ese sentido, es probable que la pasada epidemia de uso de heroína endovenosa haya repercutido en la elevada prevalencia de infección en la población (Comberg et al., 2011).

### Historia natural de la Hepatitis C

El VHC provoca una infección aguda que cursa de forma asintomática en la mayoría de los casos. Cerca del 20-25% de los pacientes con abuso de sustancias eliminarán espontáneamente la viremia en los 6 meses siguientes a la infección (Grebely et al., 2012; Page et al., 2009). Entre los factores que se asocian a la curación espontánea de la infección está el sexo femenino, la infección por el genotipo 1 (el más frecuente en nuestro entorno) y ser homocigoto para el gen de la Interleukina-28 (IL-28B), gen que codifica la proteí-



Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón

na Interleukina-23, involucrada en la replicación del VHC (Liu, Fisher, Thomas, Cox, y Ray, 2012; Page et al., 2009). Por otro lado, el 75-80% de los infectados desarrollarán una infección crónica y el riesgo de desarrollar cirrosis hepática, CHC, u otras complicaciones extra-hepáticas puede ser relativamente elevado a medio y largo plazo (Grebely, deVlaming, Duncan, Viljoen, y Conway, 2008), sobre todo si tenemos en cuenta que la mayoría de los pacientes con historia de abuso de sustancias se infectan a edades muy tempranas.

En la infección crónica por el VHC, la alteración histológica hepática se caracteriza por la necro-inflamación portal y lobular. En la tercera parte de los pacientes, la infección tendrá un curso indolente pero en el resto, habrá un progresivo aumento de la fibrosis hepática, que se manifestará clínicamente con el paso de los años (Afdhal, 2004). La progresión de la fibrosis hepática no es un proceso lineal ya que factores como la infección por el VIH, el VHB, consumo de alcohol y otros pueden acelerarla (Muga et al., 2012; Cartón et al., 2011); edad en el momento de la infección, sexo masculino, obesidad, diabetes mellitus y esteatosis hepática también se han visto asociadas a mayor riesgo de progresión de la fibrosis (Afdhal, 2004; Poynard, Bedossa, y Opolon, 1997). Una vez establecida la fase final de la enfermedad o cirrosis hepática, la probabilidad de presentar una descompensación es del 5% el primer año y del 30% a los 10 años del diagnóstico, mientras que el riesgo de aparición de CHC es del 1-4% por año (Dore, Freeman, Law, y Kaldor, 2003; Raimondi, Bruno, Mondelli, y Maisonneuve, 2009). En líneas generales se acepta que la mediana de la supervivencia de pacientes que presentan una primera descompensación de la cirrosis hepática es de 5 años (Dore et al., 2003).

### Diagnóstico y evaluación

La fibrosis hepática es el principal marcador de evolución de la enfermedad hepática (Thomas y Seeff, 2005). La biopsia hepática se ha considerado el método más fiable para evaluar la presencia de fibrosis en el hígado y, por tanto, la herramienta idónea para seleccionar los candidatos al tratamiento. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos no invasivos para evaluar el grado de fibrosis sin necesidad de un procedimiento invasivo. Elastografía hepática y marcadores bioquímicos adquieren cada vez mayor protagonismo en la evaluación de la fibrosis hepática (de Ledinghen et al., 2006; Sanvisens et al., 2009; Sterling et al., 2006; Wai et al., 2003).

Entre los marcadores bioquímicos, el índice APRI (AST-to-Platelet Ratio Index) o el FIB-4 (edad, AST, ALT y plaquetas) son fáciles de usar, ya que para su cálculo se necesitan parámetros que forman parte de la evaluación clínica rutinaria de un paciente con enfermedad hepática. Estos dos índices son los que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la recientemente publicada Guía sobre diagnóstico, atención y tratamiento a pacientes con VHC

(World Health Organization, 2014) y además, han sido validados en pacientes con VHC (Mallet et al., 2009; Vallet-Pichard et al., 2007; Wong et al., 2010), si bien su validez en pacientes con consumo crónico de alcohol estaría limitada.

Conocer la magnitud del daño hepático en este grupo de pacientes con hepatitis crónica C es de vital importancia ante la llegada de nuevos regímenes terapéuticos. En nuestra experiencia, la prevalencia de fibrosis hepática moderada y severa es del 40% y 17%, respectivamente en esta población (Sanvisens et al., 2011).

### Situación actual del tratamiento de la hepatitis C en pacientes con abuso de sustancias

La prevalencia de infección por VHC en personas que consumen drogas por vía parenteral es muy elevada (50%-80%) y, los genotipos más comunes son el 1a, 1b y 3 (Robaey et al., 2013). A pesar de tratarse de la población de mayor riesgo de infección, estos pacientes suelen quedar al margen del tratamiento de la hepatitis crónica C. Según la Unión Europea, el número de pacientes tratados de hepatitis C no alcanza el 0,5% de las 700.000 personas que actualmente reciben tratamiento de metadona (Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2011).

En general, el tratamiento vigente de la hepatitis C se mantiene entre 24 y 48 semanas y los fármacos empleados son Interferón-alfa pegilado (PEG-IFN), Ribavirina (RBV) y Boceprevir o Telaprevir, éstos últimos como inhibidores de la proteasa de primera generación (World Health Organization, 2014). El tratamiento con PEG-IFN consiste en la administración de inyecciones subcutáneas semanales y los efectos secundarios son bien conocidos incluyendo síntomas gripales, ansiedad, depresión, astenia y citopenias que, si afectan a la serie roja, pueden requerir eritropoyetina (Chung, 2012). El objetivo final del tratamiento de la hepatitis C es la erradicación del virus; la llamada respuesta viral sostenida (RVS) indica que el RNA del VHC se mantiene indetectable a los 6 meses de finalizar el tratamiento. Por sus efectos adversos, en mayor medida sobre el SNC, una parte de los pacientes que reciben PEG-IFN deben añadir antidepressivos al tratamiento de la hepatitis C.

En pacientes con historia de abuso de sustancias, la realidad asistencial del tratamiento de la hepatitis C es que sólo una minoría son tratados (Grebely et al., 2008; Mehta et al., 2008); los motivos para no recibir el tratamiento son múltiples aunque tres de ellos destacan sobre los demás: riesgo de mal cumplimiento terapéutico, de reinfección y de agravamiento de la co-morbilidad psiquiátrica (Edlin, 2002; Kramer et al., 2011).

A nivel asistencial todavía existen otras barreras para acceder al tratamiento de la hepatitis crónica C como la falta de entornos asistenciales adecuados para el tratamiento de esta población o la insuficiente formación clínica en el manejo de

Roberto Muga, Paola Zuluaga, Arantza Sanvisens, Inmaculada Rivas, Daniel Fuster, Ferran Bolao, Jordi Tor, Red de Trastornos Adictivos-RTA

Tabla 1.  
Principales dificultades en el acceso al tratamiento de la hepatitis crónica C en pacientes con abuso de sustancias

Del sistema sanitario	De los pacientes
<p>Conocimiento insuficiente de la hepatitis C:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Formación limitada</li> <li>- Inexperiencia en la evaluación del daño hepático</li> <li>- Baja percepción de la necesidad de tratamiento:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad asintomática</li> <li>• Desconocimiento del estadio de la fibrosis</li> <li>• Otras co-morbididades prioritarias</li> </ul> </li> </ul> <p>Percepciones erróneas acerca del tratamiento:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto riesgo / beneficio</li> <li>- Pacientes con abuso de sustancias son malos candidatos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicción / Enfermedad psiquiátrica</li> <li>• Mala adherencia</li> </ul> </li> </ul> <p>Pérdidas de entrada o entradas retardadas en el circuito asistencial para la hepatitis C</p>	<p>Conocimiento inadecuado de la hepatitis C:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Educación limitada en relación al VHC</li> </ul> <p>Baja percepción de la necesidad de tratamiento :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfermedad asintomática</li> <li>- Desconocimiento del estadio de la fibrosis</li> <li>- Otras co-morbididades prioritarias</li> </ul> <p>Percepciones erróneas acerca del tratamiento:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto riesgo / beneficio</li> <li>- Temor a la complejidad del tratamiento y efectos secundarios</li> </ul> <p>Poca retención en los circuitos asistenciales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adicción / Enfermedad psiquiátrica</li> <li>- Acceso inadecuado a los circuitos asistenciales</li> <li>- Estigmas / peores condiciones sociales</li> </ul>

la enfermedad hepática y en el abuso de sustancias (Grebely y Tyndall, 2011; Litwin et al., 2007; Reimer y Haasen, 2009). En nuestro país, aunque el cribado de la prueba diagnóstica es elevado, la evaluación del abuso de sustancias y de la co-morbilidad médica y psiquiátrica es heterogénea y concierne a varias especialidades; además, los circuitos asistenciales de evaluación de la toxicomanía, psicopatología y hepatopatía son interminables y en nada favorecen la retención de estos pacientes en el sistema sanitario. La falta de conocimiento de la enfermedad por los propios afectados y de soporte social también se han descrito como barreras de acceso al tratamiento (Alavi et al., 2013). La tabla 1 muestra un resumen de las principales barreras de acceso al tratamiento del VHC.

Diferentes estudios indican que el consumo de alcohol o de sustancias no suele comprometer la adherencia al tratamiento de la hepatitis C ni implica peores tasas de respuesta al mismo, si bien se ha observado una mayor dificultad para completarlo (Anand et al., 2006; Grebely y Tyndall, 2011; Hellard, Sacks-Davis, y Gold, 2009). Una revisión sistemática reciente sobre usuarios de drogas elegibles para el tratamiento del VHC con PEG-IFN y RBV mostró una RVS global del 56% (37% para genotipos 1/4 y 67% para 2/3) (Aspinall et al., 2013); estas cifras son algo inferiores a las de la mayoría de ensayos clínicos para estos fármacos, si bien son similares a las descritas en dos estudios de efectividad del tratamiento (39%-46% para genotipo 1 y 70%-84% para genotipo 2/3) (Borroni et al., 2008; Innes et al., 2012). En esta misma revisión sistemática (Aspinall et al., 2013) se observó una elevada adherencia al tratamiento, del 83%, algo superior a la mostrada en pacientes no usuarios de drogas (McHutchison et al., 2002; Ravi, Nasiri Toosi, Karimzadeh, Ahadi-Barzoki, y Khalili, 2013), si bien las diferencias observadas se explicarían por la propia definición de adherencia; además, la tasa de reinfección por VHC fue moderada (2.4 por 100p-a) sugiriendo que ésta tiene poco impacto en la efectividad del tratamiento a largo plazo (Aspinall et al., 2013).

### Cambio de paradigma; nuevos tratamientos para la hepatitis C libres de IFN

El creciente número de pacientes que necesitarán tratamiento de la hepatitis C, las contraindicaciones y efectos secundarios del tratamiento actual con IFN y el mejor conocimiento del ciclo vital del VHC han llevado a desarrollar nuevos fármacos. La aparición de regímenes de tratamiento sin IFN va a suponer un avance fundamental para aumentar el acceso al tratamiento. Todo apunta a que los pacientes con historia de abuso de sustancias y hepatitis C no van a ser la excepción.

Este cambio de paradigma en el tratamiento de la hepatitis C empieza a ser una realidad desde la aprobación en los EE.UU de los inhibidores de la proteasa de segunda generación y del primer inhibidor de la polimerasa del VHC en 2013. El primer paso en la dirección de los nuevos regímenes de tratamiento se dio a partir del 2011 con la introducción de inhibidores de la proteasa del VHC de primera generación (Telaprevir y Boceprevir).

La segunda generación de inhibidores de la proteasa aporta mayor barrera de resistencia farmacológica, menos efectos adversos y actividad farmacológica ampliada contra otros genotipos del VHC (Wendt et al., 2014). Proteasa y polimerasa son proteínas clave en el ciclo vital del VHC, sólo conocido con detalle en los últimos años. Varias compañías farmacéuticas han analizado dianas terapéuticas en zonas clave del virus. La identificación de estas nuevas dianas terapéuticas, basadas en atacar proteínas no estructurales del virus, ha permitido reconocer más de 10 Antivirales de Acción Directa (AAD). Estos agentes incluyen inhibidores de la proteasa NS3/4A, inhibidores de la polimerasa NS5B, inhibidores del complejo NS5A, inhibidores de la ciclofilina e inhibidores directos de la polimerasa del RNA viral. Antivirales frente al VHC como Sofosbuvir (Lawitz y Gane, 2013) o Simeprevir (Asselah y Marcellin, 2014) aprobados por la FDA a finales de 2013 y otros como Daclatasvir (Gentile et al., 2013), Asunaprevir (Suzuki et al., 2013), Faldaprevir, Deleobuvir (Zeuzem et al., 2013) o Ledipasvir (Link et al., 2014) son de alta eficacia y pretenden erradicar el virus mediante regímenes

Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón

terapéuticos orales de 12 semanas en algunos genotipos y con escasos efectos adversos (Gane et al., 2014; Sulkowski et al., 2014). En este sentido, la reciente Guía publicada por la OMS en Abril de 2014 ya incluye en sus recomendaciones los dos fármacos aprobados por la FDA (sofosbuvir, simeprevir), recientemente incorporados en España al Sistema Nacional de Salud y prevé una actualización periódica en función de la aparición de nuevas licencias (World Health Organization, 2014). Si bien los ensayos clínicos de los nuevos fármacos no se han realizado en pacientes consumidores de drogas por vía parenteral, la Guía de la OMS recomienda no excluir a esta población del tratamiento (máxima recomendación); asimismo, la OMS recomienda detectar consumos de alcohol elevados y ofrecer a los pacientes una intervención para reducir dicho consumo.

Cabe señalar que son necesarios estudios para analizar las posibles interacciones farmacológicas entre los AAD y los fármacos más utilizados en el tratamiento del abuso de sustancias. Simeprevir y faldaprevir se metabolizan por el sistema citocromo P450 y es posible que muestre interacciones farmacocinéticas con fármacos como metadona y buprenorfina (Mauss y Klinker, 2013).

En todo caso, las mejoras en el tratamiento farmacológico de la hepatitis C posiblemente se deban acompañar de cambios en la atención clínica a los pacientes con abuso de sustancias; diagnóstico de la infección y evaluación clínica serán importantes para priorizar el tratamiento de los más necesitados; en ese sentido, profesionales de atención primaria

y del tratamiento del abuso de sustancias deberán jugar un papel clave para que estos pacientes se evalúen clínicamente, se traten de la enfermedad y obtengan resultados terapéuticos similares a los que se esperan obtener en pacientes sin abuso de sustancias. Establecer un modelo más inclusivo de atención al paciente con hepatitis C asociada al abuso de sustancias se hará necesario ante el cambio que se avecina.

### Conclusión

La importante carga de enfermedad hepática y la elevada incidencia de infección por VHC en pacientes con abuso de sustancias hacen necesario mejorar el diagnóstico y tratamiento de esta población. Aparecen fármacos innovadores que atacan directamente proteínas responsables de formar el complejo de replicación viral del VHC; la combinación de dos o más de estos fármacos puede resultar muy eficaz contra la mayoría de genotipos del VHC y en la mayoría de situaciones clínicas, incluyendo la cirrosis hepática. Con la aparición de fármacos tan eficaces y tolerables es probable que debamos revisar el modelo asistencial actual y orientarlo hacia uno más ágil e integrador que trate al mayor número posible de pacientes infectados por el VHC. En la Figura 1 se muestra una aproximación a un modelo asistencial multidisciplinar. En este mismo sentido, optimizar la prevención, diagnóstico, evaluación y acceso a tratamiento de la hepatitis crónica C es prioritario. Para ello son diversos los abordajes que pueden plantearse, como por ejemplo:

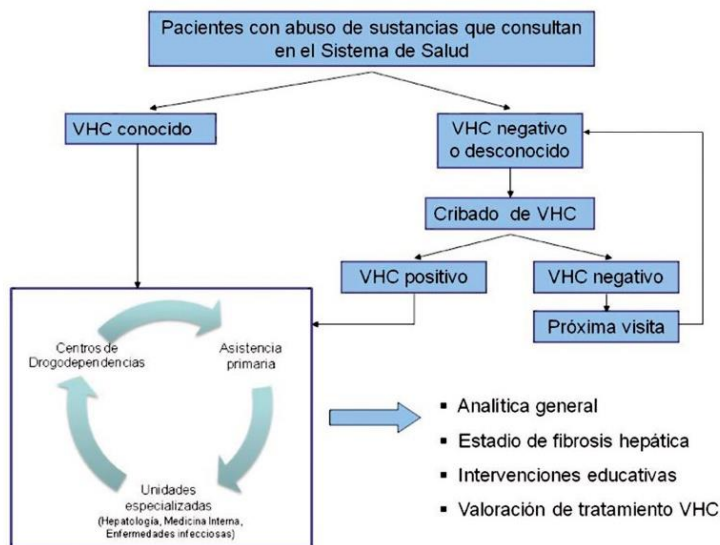


Figura 1. Modelo para aumentar la participación de pacientes con abuso de sustancias en el acceso al tratamiento de la hepatitis crónica C

Roberto Muga, Paola Zuluaga, Arantza Sanvisens, Inmaculada Rivas, Daniel Fuster, Ferran Bolao, Jordi Tor, Red de Trastornos Adictivos-RTA

- Identificar barreras y necesidades percibidas en la atención primaria y centros de atención a las drogodependencias y desarrollar tareas educativas para ampliar el conocimiento de la hepatitis crónica C,
- Revisar el proceso de evaluación clínica de pacientes con hepatitis C asociada al abuso de sustancias,
- Categorizar la situación clínica de los pacientes: nuevo diagnóstico, previamente tratados, grado de enfermedad hepática,
- Identificar pacientes a riesgo de infección por VHC y prevenir la infección mediante una intervención breve y cribado de hepatitis víricas.
- Ofrecer tratamiento del abuso de alcohol o de drogas a los pacientes con hepatitis crónica C.

### Financiación

Trabajo parcialmente financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (RETICS RD12/0028 y RD12/0028/0006), Ministerio de Sanidad (EC11-042 y PNSD 2014|042); con la colaboración del Programa Fellowship de Gilead España.

### Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Afdhal, N. H. (2004). The natural history of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, 24, 3–8. doi:10.1055/s-2004-832922
- Alavi, M., Grebely, J., Micallef, M., Dunlop, A. J., Balcomb, A. C., Day, C. A., ... Dore, G. J. (2013). Assessment and treatment of hepatitis C virus infection among people who inject drugs in the opioid substitution setting: ETHOS study. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57, S62–9. doi:10.1093/cid/cit305
- Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13, 2436–41.
- Anand, B. S., Currie, S., Dieperink, E., Bini, E. J., Shen, H., Ho, S. B., y Wright, T. (2006). Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. *Gastroenterology*, 130, 1607–1616. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.023
- Aspinall, E. J., Corson, S., Doyle, J. S., Grebely, J., Hutchinson, S. J., Dore, G. J., ... Hellard, M. E. (2013). Treatment of hepatitis C virus infection among people who are actively injecting drugs: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57, S80–89. doi:10.1093/cid/cit306
- Asselah, T., y Marcellin, P. (2014). Second-wave IFN-based triple therapy for HCV genotype 1 infection: simeprevir, faldaprevir and sofosbuvir. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 34, 60–68. doi:10.1111/liv.12424
- Borroni, G., Andreoletti, M., Casiraghi, M. A., Ceriani, R., Guerzoni, P., Omazzi, B., ... Salerno, F. (2008). Effectiveness of pegylated interferon/ribavirin combination in "real world" patients with chronic hepatitis C virus infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27, 790–797. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03657.x
- Cartón, J. A., Collazos, J., de la Fuente, B., García-Alcalde, M. L., Suarez-Zarracina, T., Rodríguez-Guardado, A., y Asensi, V. (2011). Factors associated with liver fibrosis in intravenous drug users coinfecting with HIV and HCV. *Antiviral Therapy*, 16, 27–35. doi:10.3851/IMP1708
- Chung, R. T. (2012). A watershed moment in the treatment of hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*, 366, 273–275. doi:10.1056/NEJMe1113272
- Cornberg, M., Razavi, H. A., Alberti, A., Bernasconi, E., Buti, M., Cooper, C., ... Zeuzem, S. (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31, 30–60. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02539.x
- De Ledinghen, V., Douvin, C., Kettaneh, A., Zioli, M., Roulot, D., Marcellin, P., ... Beaugrand, M. (2006). Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 41, 175–179.
- Des Jarlais, D. C., Diaz, T., Perlis, T., Vlahov, D., Maslow, C., Latka, M., ... Garfein, R. S. (2003). Variability in the incidence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among young injecting drug users in New York City. *American Journal of Epidemiology*, 157, 467–471.
- Dore, G. J., Freeman, A. J., Law, M., y Kaldor, J. M. (2003). Natural history models for hepatitis C-related liver disease: different disease progression parameters for different settings. *Antiviral Therapy*, 8, 365–372.
- Edlin, B. R. (2002). Prevention and treatment of hepatitis C in injection drug users. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36, S210–219. doi:10.1053/jhep.2002.36809
- Freeman, R. B., Steffick, D. E., Guidinger, M. K., Farmer, D. G., Berg, C. L., y Merion, R. M. (2008). Liver and intestine transplantation in the United States, 1997–2006. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8, 958–976. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02174.x
- Gane, E. J., Stedman, C. A., Hyland, R. H., Ding, X., Svarovskaia, E., Subramanian, G. M., ... Pang, P. S. (2014). Efficacy of nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus the NS5A inhibitor ledipasvir or the NS5B non-nucleoside inhibitor GS-9669 against HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology*, 146, 736–743.e1. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.007

Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón

- Gentile, I., Borgia, F., Coppola, N., Buonomo, A. R., Castaldo, G., y Borgia, G. (2014). Daclatasvir: The First of a New Class of Drugs Targeted Against Hepatitis C Virus NS5A. *Current Medicinal Chemistry*, 21, 1391-1404.
- Grebel, J., deVlaming, S., Duncan, F., Viljoen, M., y Conway, B. (2008). Current approaches to HCV infection in current and former injection drug users. *Journal of Addictive Diseases*, 27, 25-35. doi:10.1300/J069v27n02\_04
- Grebel, J., Prins, M., Hellard, M., Cox, A. L., Osburn, W. O., Lauer, G., ... Dore, G. J. (2012). Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *The Lancet Infectious Diseases*, 12, 408-414. doi:10.1016/S1473-3099(12)70010-5
- Grebel, J., Raffa, J. D., Lai, C., Krajdien, M., Kerr, T., Fischer, B., y Tyndall, M. W. (2009). Low uptake of treatment for hepatitis C virus infection in a large community-based study of inner city residents. *Journal of Viral Hepatitis*, 16, 352-358. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01080.x
- Grebel, J., y Tyndall, M. W. (2011). Management of HCV and HIV infections among people who inject drugs. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6, 501-507. doi:10.1097/COH.0b013e32834bcb36
- Hellard, M., Sacks-Davis, R., y Gold, J. (2009). Hepatitis C treatment for injection drug users: a review of the available evidence. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49, 561-573. doi:10.1086/600304
- Innes, H. A., Hutchinson, S. J., Allen, S., Bhattacharyya, D., Bramley, P., Carman, B., ... Hayes, P. (2012). Ranking predictors of a sustained viral response for patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon and ribavirin in Scotland. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 24, 646-655. doi:10.1097/MEG.0b013e32835201a4
- Kramer, J. R., Kanwal, F., Richardson, P., Giordano, T. P., Petersen, L. A., y El-Serag, H. B. (2011). Importance of patient, provider, and facility predictors of hepatitis C virus treatment in veterans: a national study. *The American Journal of Gastroenterology*, 106, 483-491. doi:10.1038/ajg.2010.430
- Lawitz, E., y Gane, E. J. (2013). Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *The New England Journal of Medicine*, 369, 678-679. doi:10.1056/NEJMc1307641
- Link, J. O., Taylor, J. G., Xu, L., Mitchell, M., Guo, H., Liu, H., ... Desai, M. C. (2014). Discovery of Ledipasvir (GS-5885): A Potent, Once-Daily Oral NS5A Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 2033-2046. doi:10.1021/jm401499g
- Litwin, A. H., Kumins, H. V., Berg, K. M., Federman, A. D., Heavner, K. K., Gourevitch, M. N., y Arnsten, J. H. (2007). Hepatitis C management by addiction medicine physicians: results from a national survey. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 33, 99-105. doi:10.1016/j.jsat.2006.12.001
- Liu, L., Fisher, B. E., Thomas, D. L., Cox, A. L., y Ray, S. C. (2012). Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55, 1684-1691. doi:10.1002/hep.25575
- Ly, K. N., Xing, J., Klevens, R. M., Jiles, R. B., Ward, J. W., y Holmberg, S. D. (2012). The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007. *Annals of Internal Medicine*, 156, 271-278. doi:10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00004
- Mallet, V., Dhalluin-Venier, V., Roussin, C., Bourliere, M., Pettinelli, M. E., Giry, C., ... Pol, S. (2009). The accuracy of the FIB-4 index for the diagnosis of mild fibrosis in chronic hepatitis B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 29, 409-415. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03895.x
- Mauss, S., y Klinker, H. (2013). Drug-drug interactions in the treatment of HCV among people who inject drugs. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57, S125-S128. doi:10.1093/cid/cit299
- McHutchison, J. G., Manns, M., Patel, K., Poynard, T., Lindsay, K. L., Trepo, C., ... Albrecht, J. K. (2002). Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 123, 1061-1069.
- Mehta, S. H., Genberg, B. L., Astemborski, J., Kavasery, R., Kirk, G. D., Vlahov, D., ... Thomas, D. L. (2008). Limited uptake of hepatitis C treatment among injection drug users. *Journal of Community Health*, 33, 126-133. doi:10.1007/s10900-007-9083-3
- Mehta, S. H., Vogt, S. L., Srikrishnan, A. K., Vasudevan, C. K., Murugavel, K. G., Saravanan, S., ... Solomon, S. S. (2010). Epidemiology of hepatitis C virus infection & liver disease among injection drug users (IDUs) in Chennai, India. *The Indian Journal of Medical Research*, 132, 706-714.
- Memon, M. I., y Memon, M. A. (2002). Hepatitis C: an epidemiological review. *Journal of Viral Hepatitis*, 9, 84-100.
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D., y Wiersma, S. T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57, 1333-1342. doi:10.1002/hep.26141
- Muga, R., Sanvisens, A., Fuster, D., Tor, J., Martinez, E., Perez-Hoyos, S., y Munoz, A. (2012). Unhealthy Alcohol Use, HIV Infection and Risk of Liver Fibrosis in Drug Users with Hepatitis C. *Plos One*, 7. doi:10.1371/journal.pone.0046810
- Nelson, P. K., Mathers, B. M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D., y Degenhardt, L. (2011). Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*, 378, 571-583. doi:10.1016/S0140-6736(11)61097-0

Roberto Muga, Paola Zuluaga, Arantza Sanvisens, Inmaculada Rivas, Daniel Fuster, Ferran Bolao, Jordi Tor, Red de Trastornos Adictivos-RTA

- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. (2011) *Informe anual 2011: el problema de la drogodependencia en Europa*. Recuperado de [http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att\\_143743\\_ES\\_EMCD-DA\\_AR2011\\_ES.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_143743_ES_EMCD-DA_AR2011_ES.pdf)
- Page, K., Hahn, J. A., Evans, J., Shiboski, S., Lum, P., Delwart, E., ... Busch, M. P. (2009). Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. *The Journal of Infectious Diseases*, 200, 1216–1226. doi:10.1086/605947
- Page, K., Morris, M. D., Hahn, J. A., Maher, L., y Prins, M. (2013). Injection drug use and hepatitis C virus infection in young adult injectors: using evidence to inform comprehensive prevention. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57, S32–38. doi:10.1093/cid/cit300
- Poynard, T., Bedossa, P., y Opolon, P. (1997). Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*, 349, 825–832.
- Raimondi, S., Bruno, S., Mondelli, M. U., y Maisonneuve, P. (2009). Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 50, 1142–1154. doi:10.1016/j.jhep.2009.01.019
- Ravi, S., Nasiri Toosi, M., Karimzadeh, I., Ahadi-Barzoki, M., y Khalili, H. (2013). Adherence to chronic hepatitis C treatment regimen: first report from a referral center in Iran. *Hepatitis Monthly*, 13, e11038. doi:10.5812/hepatmon.11038
- Reimer, J., y Haasen, C. (2009). Need-adapted HCV-treatment setting for injection drug users. *Lancet*, 373, 2090–2091. doi:10.1016/S0140-6736(09)60347-0
- Rein, D. B., Smith, B. D., Wittenborn, J. S., Lesesne, S. B., Wagner, L. D., Roblin, D. W., ... Weinbaum, C. M. (2012). The cost-effectiveness of birth-cohort screening for hepatitis C antibody in U.S. primary care settings. *Annals of Internal Medicine*, 156, 263–270. doi:10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00378
- Rein, D. B., Wittenborn, J. S., Weinbaum, C. M., Sabin, M., Smith, B. D., y Lesesne, S. B. (2011). Forecasting the morbidity and mortality associated with prevalent cases of pre-cirrhotic chronic hepatitis C in the United States. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 43, 66–72. doi:10.1016/j.dld.2010.05.006
- Rivas, I., Sanvisens, A., Bolao, F., Fuster, D., Tor, J., Pujol, R., ... Muga, R. (2013). Impact of medical comorbidity and risk of death in 680 patients with alcohol use disorders. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 37, E221–227. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01861.x
- Robaey, G., Grebely, J., Mauss, S., Bruggmann, P., Moussalli, J., De Gottardi, A., ... Dore, G. J. (2013). Recommendations for the management of hepatitis C virus infection among people who inject drugs. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57, S129–137. doi:10.1093/cid/cit302
- Sanvisens, A., Fuster, D., Serra, I., Tor, J., Tural, C., Rey-Joly, C., y Muga, R. (2011). Estimated liver fibrosis and its impact on all-cause mortality of HCV-monoinfected and HCV/HIV-coinfected drug users. *Current HIV Research*, 9, 256–262. doi:10.2174/157016211796320298
- Sanvisens, A., Serra, I., Tural, C., Tor, J., Ojanguren, I., Barluenga, E., ... Muga, R. (2009). Hyaluronic acid, transforming growth factor-beta and hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus co-infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 16, 513–518.
- Shepard, C. W., Finelli, L., y Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 5, 558–567. doi:10.1016/S1473-3099(05)70216-4
- Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., ... Investigators, A. C. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43, 1317–1325. doi:10.1002/hep.21178
- Sulkowski, M. S., Gardiner, D. F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K. R., Hassanein, T., Jacobson, I., ... Grasela, D. M. (2014). Daclatasvir plus Sofosbuvir for Previously Treated or Untreated Chronic HCV Infection. *New England Journal of Medicine*, 370, 211–221. doi:10.1056/NEJMoa1306218
- Suzuki, Y., Ikeda, K., Suzuki, F., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., ... Kumada, H. (2013). Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *Journal of Hepatology*, 58, 655–662. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.037
- Thomas, D. L., y Seeff, L. B. (2005). Natural history of hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, 9, 383–398. vi. doi:10.1016/j.cld.2005.05.003
- Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Nalpas, B., Verkarre, V., Nalpas, A., Dhalluin-Venier, V., ... Pol, S. (2007). FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46, 32–36. doi:10.1002/hep.21669
- Wai, C. T., Greenson, J. K., Fontana, R. J., Kalbfleisch, J. D., Marrero, J. A., Conjeevaram, H. S., y Lok, A. S. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38, 518–526. doi:10.1053/jhep.2003.50346
- Wendt, A., Adhoue, X., Castellani, P., Oules, V., Ansaldi, C., Benali, S., y Bourlière, M. (2014). Chronic hepatitis C: future treatment. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 6, 1–17. doi:10.2147/CPAA.S30338

Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón

- Wong, V. W.-S., Vergniol, J., Wong, G. L.-H., Foucher, J., Chan, H. L.-Y., Le Bail, B., ... de Lédinghen, V. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *51*, 454–462. doi:10.1002/hep.23312
- World Health Organization. (2014). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. Recuperado de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755_eng.pdf?ua=1&ua=1)
- Yang, J. D., Kim, W. R., Coelho, R., Mettler, T. A., Benson, J. T., Sanderson, S. O., ... Roberts, L. R. (2011). Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, *9*, 64–70. doi:10.1016/j.cgh.2010.08.019
- Zeuzem, S., Asselah, T., Angus, P., Zarski, J.-P., Larrey, D., Müllhaupt, B., ... Mensa, F. J. (2013). Faldaprevir (BI 201335), deleobuvir (BI 207127) and ribavirin oral therapy for treatment-naïve HCV genotype 1: SOUND-C1 final results. *Antiviral Therapy*, *18*, 1015-1019. doi:10.3851/IMP2567

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102



- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Fuster, D; Rivas, I; Tor, J; Marcos, M; Chamorro, AJ; Muga, R. Long-Term Mortality of Patients with an Alcohol-Related Wernicke-Korsakoff Syndrome. Alcohol Alcohol 2017;52:466–471. Pag 97-102

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108



- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108

- Sanvisens, A; **Zuluaga, P**; Pineda, M; Fuster, D; Bolao, F; Juncà, J; Tor, J; Muga, R. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. Drug Alcohol Depend; 2017;180:417-422. Pag 103-108

## **ANEXO 2. Fuentes de financiación**

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de proyectos de investigación del Servicio de Medicina Interna, Unidad de Adicciones del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, por parte del Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (Red de Trastornos Adictivos- RETICS (RD12/0028/0006 y RD16/0017/0003), Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional sobre Drogas 2014/042) y Gilead Fellowship Program 2013.

## REFERENCIAS

**REFERENCIAS**

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
2. Connor JP, Haber PS, Hall WD. Alcohol use disorders. *Lancet*. 2016;387(10022):988–98.
3. World Health Organization. Global Status Report on Alcohol. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. McCambridge J, McAlaney J, Rowe R. Adult consequences of late adolescent alcohol consumption: a systematic review of cohort studies. *PLoS Med*. 2011;8(2):e1000413.
5. Friedmann PD. Clinical practice. Alcohol use in adults. *N Engl J Med*. 2013;368(4):365–73.
6. Alonso J, Angermeyer MC, Bernert S, Bruffaerts R, Brugha TS, Bryson H, et al. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. *Acta Psychiatr Scand*. 2004;109(s420):21–7.
7. Observatorio Español de las Drogas y las Toxicomanías, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Informe 2011. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España. Madrid: Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad; 2011. Disponible en:  
<http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/oed2011.pdf>
8. Sanvisens A, Zuluaga P, Rivas I, Rubio G, Gual A, Torrens M, et al. Patients with alcohol use disorder: initial results from a prospective multicenter registry in the Spanish Network on Addiction Disorders. *CohRTA Study. Adicciones*. 2017;0(0):931.
9. Edelman EJ, Fiellin DA. Alcohol Use. *Ann Intern Med* . 2016;164(1):ITC1.

10. Saitz R. Most inpatients with unhealthy alcohol use have an alcohol use disorder. *Int J Public Health*. 2010;55(6):527–8.
11. Srisurapanont M, Jarusuraisin N. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane database Syst Rev*. 2005;(1):CD001867.
12. Soyka M, Kranzler HR, Hesselbrock V, Kasper S, Mutschler J, Möller H-J, et al. Guidelines for biological treatment of substance use and related disorders, part 1: Alcoholism, first revision. *World J Biol Psychiatry*. 2017;18(2):86–119.
13. Rösner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Lehert P, Vecchi S, Soyka M. Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane database Syst Rev*. 2010;(9):CD004332.
14. Whitlock EP, Polen MR, Green CA, Orleans T, Klein J, Force USPST. Behavioral counseling interventions in primary care to reduce risky/harmful alcohol use by adults: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004;140(7):557–68.
15. Bullock KD, Reed RJ, Grant I. Reduced mortality risk in alcoholics who achieve long-term abstinence. *JAMA*. 1992 5;267(5):668–72.
16. Miller NS. Mortality risks in alcoholism and effects of abstinence and addiction treatment. *Psychiatr Clin North Am*. 1999;22(2):371–83.
17. Rehm J, Gmel GE, Gmel G, Hasan OSM, Imtiaz S, Popova S, et al. The relationship between different dimensions of alcohol use and the burden of disease-an update. *Addiction*. 2017;112(6):968–1001.
18. Rehm J, Dawson D, Frick U, Gmel G, Roerecke M, Shield KD, et al. Burden of Disease Associated with Alcohol Use Disorders in the United States. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(4):1068–77.
19. Rehm J, Shield KD. Global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis, and injury in 2010. *Alcohol Res*. 2013;35(2):174–83.
20. Anderson P, Gual A, Colom J. Alcohol y atención primaria de la salud:

- informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2008.
21. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res.* 2013;35(2):155–73.
  22. Whitman IR, Agarwal V, Nah G, Dukes JW, Vittinghoff E, Dewland TA, et al. Alcohol Abuse and Cardiac Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(1):13–24.
  23. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans.* 2012;100(Pt E):1–538.
  24. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans.* 2010;96:3–1383.
  25. Rivas I, Sanvisens A, Bolao F, Fuster D, Tor J, Pujol R, et al. Impact of medical comorbidity and risk of death in 680 patients with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37 Suppl 1:E221-7.
  26. Ratna A, Mandrekar P. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. *Biomolecules.* 2017;7(3):61.
  27. Steiner JL, Lang CH. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;89:125–35.
  28. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2003;62–81.
  29. Fusco A. The “golden age” of DNA methylation in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(3):523–34.
  30. Thomson AD. Mechanisms of vitamin deficiency in chronic alcohol misusers and the development of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol Suppl.* 2000;35(1):2–7.



31. Harper C, Fornes P, Duyckaerts C, Lecomte D, Hauw JJ. An international perspective on the prevalence of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Metab Brain Dis.* 1995;10(1):17–24.
32. Savage D, Lindenbaum J. Anemia in alcoholics. *Medicine (Baltimore).* 1986;65(5):322–38.
33. Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate. *Br Med Bull.* 1999;55(3):669–82.
34. Medici V, Halsted CH. Folate, alcohol, and liver disease. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(4):596–606.
35. Halsted CH, Medici V. Aberrant hepatic methionine metabolism and gene methylation in the pathogenesis and treatment of alcoholic steatohepatitis. *Int J Hepatol.* 2012;2012:959746.
36. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene.* 2014;533(1):11–20.
37. Sanvisens A, Zuluaga P, Pineda M, Fuster D, Bolao F, Junca J, et al. Folate deficiency in patients seeking treatment of alcohol use disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2017;180:417–22.
38. Sanvisens A, Zuluaga P, Fuster D, Rivas I, Tor J, Marcos M, et al. Long-term mortality of patients with an alcohol-related Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol.* 2017;52(4).
39. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res.* 2015;37(2):159–70.
40. Szabo G, Wands JR, Eken A, Osna NA, Weinman SA, Machida K, et al. Alcohol and hepatitis C virus--interactions in immune dysfunctions and liver damage. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34(10):1675–86.
41. Muga R, Sanvisens A, Fuster D, Tor J, Martinez E, Perez-Hoyos S, et al. Unhealthy Alcohol Use, HIV Infection and Risk of Liver Fibrosis in Drug Users

- with Hepatitis C. *PLoS One*. 2012;7(10): e46810.
42. Muga R, Zuluaga P, Sanvisens A, Rivas I, Fuster D, Bolao F, et al. Hepatitis C associated with substance abuse: Ever closer to a treatment without Interferon | Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: Nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón. *Adicciones*. 2015;27(2):141–9.
  43. Bhatti M, Pruett SB, Swiatlo E, Nanduri B. Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol*. 2011;45(6):523–39.
  44. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, et al. Pneumococcal Serotypes and Mortality following Invasive Pneumococcal Disease: A Population-Based Cohort Study. *PLoS Med*. 2009;6(5):e1000081.
  45. Volkmann T, Moonan PK, Miramontes R, Oeltmann JE. Tuberculosis and excess alcohol use in the United States, 1997-2012. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(1):111–9.
  46. Murphy K. *Janeway's Immunology Biology*. 8th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012.
  47. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(2):240–73.
  48. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):1–3.
  49. Spiering MJ. Primer on the Immune System. *Alcohol Res*. 2015;37(2):171–5.
  50. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):626–35.
  51. Becattini S, Latorre D, Mele F, Foglierini M, De Gregorio C, Cassotta A, et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4<sup>+</sup> T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science*. 2015;347(6220):400–6.

52. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73(11):975–83.
53. Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol*. 2014;5:630.
54. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2076–82.
55. Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):767–77.
56. D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: Saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol*. 2011;82(4):333–40.
57. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(7):2828–35.
58. García-Dabrio MC, Pujol-Moix N, Martínez-Perez A, Fontcuberta J, Souto JC, Soria JM, et al. Influence of age, gender and lifestyle in lymphocyte subsets: report from the Spanish Gait-2 Study. *Acta Haematol*. 2012;127(4):244–9.
59. Zhang Z-X, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, et al. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol*. 2006;177(10):6920–9.
60. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):739–48.
61. Ford MS, Young KJ, Zhang Z, Ohashi PS, Zhang L. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2002;196(2):261–7.

62. Hillhouse EE, Delisle J-S, Lesage S. Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol.* 2013;4:6.
63. Fritz EA, Geisbert JB, Geisbert TW, Hensley LE, Reed DS. Cellular Immune Response to Marburg Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *Viral Immunol.* 2008;21(3):355–64.
64. Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One.* 2011;6(5):e20145.
65. Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, Farre A, Addey C, Tartelin M-L, et al. Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J Immunol.* 2013;190(1):184–94.
66. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2088–94.
67. Nel AE, Slaughter N. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(6):901–15.
68. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:171–92.
69. Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol.* 2011;12(6):467–71.
70. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol.* 2003;4(9):835–42.
71. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):320–6.
72. Sad S, Krishnan L. Maintenance and attrition of T-cell memory. *Crit Rev*

- Immunol. 2003;23(1–2):129–47.
73. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis.* 2005;9(1):1–35.
74. Lee S-L, Chau G-Y, Yao C-T, Wu C-W, Yin S-J. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(7):1132–42.
75. Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003;27(3):220–31.
76. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):667–85.
77. Buck MD, O’Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med.* 2015;212(9):1345–60.
78. Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Summer WR. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J Infect Dis.* 1989;160(3):422–9.
79. Szabo G, Mandrekar P, Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leukoc Biol.* 1995;58(3):342–50.
80. Szabo G. Monocytes, alcohol use, and altered immunity. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(5 Suppl):216S–219S.
81. Duryee MJ, Klassen LW, Freeman TL, Willis MS, Tuma DJ, Thiele GM. Lipopolysaccharide is a cofactor for malondialdehyde-acetaldehyde adduct-mediated cytokine/chemokine release by rat sinusoidal liver endothelial and Kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(12):1931–8.
82. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2002;27(1):53–61.
83. Manzardo AM, Poje AB, Penick EC, Butler MG. Multiplex Immunoassay of Plasma Cytokine Levels in Men with Alcoholism and the Relationship to Psychiatric Assessments. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):472.

84. Boé DM, Nelson S, Zhang P, Bagby GJ. Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2001;184(9):1134–42.
85. Gandhi JA, Ekhar V V, Asplund MB, Abdulkareem AF, Ahmadi M, Coelho C, et al. Alcohol enhances *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia and systemic dissemination by impairing neutrophil antimicrobial activity in a murine model of infection. *PLoS One*. 2014;9(4):e95707.
86. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. Immune system and alcoholic liver disease. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(7):263–9.
87. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):513–28.
88. Laso FJ, Madruga JI, Giron JA, Lopez A, Ciudad J, San Miguel JF, et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology*. 1997;25(5):1096–100.
89. Laso FJ, Almeida J, Torres E, Vaquero JM, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(5):876–85.
90. Pasala S, Barr T, Messaoudi I. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. *Alcohol Res*. 2015;37(2):185–97.
91. Mcfarland W, Libre EP. Abnormal leukocyte response in alcoholism. *Ann Intern Med*. 1963;59:865–77.
92. Helm RM, Wheeler G, Burks AW, Hakkak R, Badger TM. Flow cytometric analysis of lymphocytes from rats following chronic ethanol treatment. *Alcohol*. 1996;13(5):467–71.

93. Young GP, Dudley FJ, Van Der Weyden MB. Suppressive effect of alcoholic liver disease sera on lymphocyte transformation. *Gut*. 1979;20(10):833–9.
94. Tønnesen H, Andersen JR, Pedersen AE, Kaiser AH. Lymphopenia in heavy drinkers--reversibility and relation to the duration of drinking episodes. *Ann Med*. 1990;22(4):229–31.
95. Naude CE, Bouic P, Senekal M, Kidd M, Ferrett HL, Fein G, et al. Lymphocyte measures in treatment-naive 13-15-year old adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol*. 2011;45(5):507–14.
96. Shao H, Zhou J, Ewald SJ. Regulation of signal transduction and DNA fragmentation in thymocytes by ethanol. *Cell Immunol*. 1995;164(1):11–9.
97. Singal AK, Charlton MR. Nutrition in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 2012;16(4):805–26.
98. Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57 Suppl 1:S66-9.
99. Laso FJ, Madruga JI, Lopez A, Ciudad J, Alvarez-Mon M, San Miguel J, et al. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(9):1564–8.
100. Cook RT, Zhu X, Coleman RA, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Ray NB, et al. T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol*. 2004;33(3):175–81.
101. 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*. 1998;22(4):897–901.
102. Jerrells TR. Role of activated CD8+ T cells in the initiation and continuation of hepatic damage. *Alcohol*. 2002;27(1):47–52.
103. Zaldivar Fujigaki JL, Arroyo Valerio AG, López Alvarenga JC, Gutiérrez Reyes EG, Kershenobich D, Hernández Ruiz J. Alterations in Activation, Cytotoxic

- Capacity and Trafficking Profile of Peripheral CD8 T Cells in Young Adult Binge Drinkers. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132521.
104. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134(1):17–32.
105. Hemann EA, McGill JL, Waldschmidt TJ, Legge KL. Chronic ethanol exposure selectively inhibits the influenza-specific CD8 T cell response during influenza A virus infection. *Alcohol*. 2013;47(7):571.
106. Parlet CP, Waldschmidt TJ, Schlueter AJ. Chronic ethanol feeding induces subset loss and hyporesponsiveness in skin T cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(5):1356–64.
107. Percival SS, Sims CA. Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. *J Nutr*. 2000;130(5):1091–4.
108. Fan J, Edsen-Moore MR, Turner LE, Cook RT, Legge KL, Waldschmidt TJ, et al. Mechanisms by which chronic ethanol feeding limits the ability of dendritic cells to stimulate T-cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(1):47–59.
109. Cook RT, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Cook BL, Booth BM, Stewart BC, et al. Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leukocyte common antigen, and beta-integrin. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18(1):71–80.
110. Song K, Coleman RA, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Mortari F, et al. TH1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2001;24(3):155–67.
111. 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*. 1995;19(3):555–63.
112. Song K, Coleman RA, Zhu X, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, et al. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*.



- 2002;72(6):1109–16.
113. Willis MS, Klassen LW, Tuma DJ, Sorrell MF, Thiele GM. Adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) induces antibody production and enhances T-cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26(1):94–106.
  114. Mattern T, Flad HD, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ. Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *J Immunol.* 1998;160(7):3412–8.
  115. Zhang H, Meadows GG. Chronic alcohol consumption in mice increases the proportion of peripheral memory T cells by homeostatic proliferation. *J Leukoc Biol.* 2005;78(5):1070–80.
  116. Hosokawa K, Muranski P, Feng X, Townsley DM, Liu B, Knickelbein J, et al. Memory Stem T Cells in Autoimmune Disease: High Frequency of Circulating CD8+ Memory Stem Cells in Acquired Aplastic Anemia. *J Immunol.* 2016;196(4):1568–78.
  117. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell.* 2004;117(2):265–77.
  118. Theofilopoulos AN, Dummer W, Kono DH. T cell homeostasis and systemic autoimmunity. *J Clin Invest.* 2001;108(3):335–40.
  119. Happel KI, Odden AR, Zhang P, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S. Acute alcohol intoxication suppresses the interleukin 23 response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(7):1200–7.
  120. Heinz R, Waltenbaugh C. Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(10):1759–71.
  121. Trevejo-Nunez G, Chen K, Dufour JP, Bagby GJ, Horne WT, Nelson S, et al. Ethanol impairs mucosal immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection by disrupting interleukin 17 gene expression. *Infect Immun.* 2015;83(5):2082–8.
  122. Ronis MJJ, Butura A, Korourian S, Shankar K, Simpson P, Badeaux J, et al.

- Cytokine and chemokine expression associated with steatohepatitis and hepatocyte proliferation in rats fed ethanol via total enteral nutrition. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(3):344–55.
123. Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(5):846–54.
124. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;181(1):71–7.
125. Kapasi AA, Patel G, Goenka A, Nahar N, Modi N, Bhaskaran M, et al. Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Immunology*. 2003;108(3):313–20.
126. Kelkar S, Dong Q, Xiao Y, Joshi-Barve S, McClain CJ, Barve SS. Ethanol enhances activation-induced caspase-3 dependent cell death in T lymphocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(3):363–70.
127. Rehman S, Chandel N, Salhan D, Rai P, Sharma B, Singh T, et al. Ethanol and vitamin D receptor in T cell apoptosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(1):251–61.
128. European Network for Translational Immunology Research and Education. Standard operating procedure FASCIA. European Network for Translational Immunology Research and Education. 2010. Disponible en: <http://entire-net.eu/wp-content/uploads/2012/09/FASCIA-SOP.pdf>
129. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191–200.
130. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Banc de Sang i Teixits. Donantes. Generalitat de Catalunya, 2017. Disponible en:

- [https://www.bancsang.net/donants/es\\_index/](https://www.bancsang.net/donants/es_index/)
131. Das BR, Bhanushali AA, Khadapkar R, Jeswani KD, Bhavsar M, Dasgupta A. Reference ranges for lymphocyte subsets in adults from western India: influence of sex, age and method of enumeration. *Indian J Med Sci.* 2008;62(10):397–406.
  132. Fahey JL, Schnelle JF, Boscardin J, Thomas JK, Gorre ME, Aziz N, et al. Distinct categories of immunologic changes in frail elderly. *Mech Ageing Dev.* 2000;115(1–2):1–20.
  133. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology.* 2014;219(7):487–96.
  134. Murray SE, Lallman HR, Heard AD, Rittenberg MB, Stenzel-Poore MP. A genetic model of stress displays decreased lymphocytes and impaired antibody responses without altered susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2001;167(2):691–8.
  135. Bouillanne O, Morineau G, Dupont C, Coulombel I, Vincent J-P, Nicolis I. Geriatric Nutritional Risk Index : a new index for evaluating at-risk. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(7):777–83.
  136. Liang Q, Jiao Y, Zhang T, Wang R, Li W, Zhang H, et al. Double Negative (DN) [CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>] T cells correlate with disease progression during HIV infection. *Immunol Invest.* 2013;42(5):431–7.
  137. Lu X, Su B, Xia H, Zhang X, Liu Z, Ji Y, et al. Low Double-Negative CD3(+)CD4(-)CD8(-) T Cells Are Associated with Incomplete Restoration of CD4(+) T Cells and Higher Immune Activation in HIV-1 Immunological Non-Responders. *Front Immunol.* 2016;7:579.
  138. Petitjean G, Chevalier MF, Tibaoui F, Didier C, Manea ME, Liovat A-S, et al.

- Level of double negative T cells, which produce TGF- $\beta$  and IL-10, predicts CD8 T-cell activation in primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2012;26(2):139–48.
139. Milush JM, Mir KD, Sundaravaradan V, Gordon SN, Engram J, Cano CA, et al. Lack of clinical AIDS in SIV-infected sooty mangabeys with significant CD4+ T cell loss is associated with double-negative T cells. *J Clin Invest*. 2011;121(3):1102–10.
140. Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, et al. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. *BMC Infect Dis*. 2011;11(1):43.
141. Sato N, Lindros KO, Baraona E, Ikejima K, Mezey E, Järveläinen HA, et al. Sex difference in alcohol-related organ injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5 Suppl ISBRA):40S–45S.
142. Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. Rodrigues MM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1294.
143. Linton P, Thoman ML. T cell senescence. *Front Biosci*. 2001;6:D248-61.
144. Haynes L, Eaton SM, Swain SL. Effect of age on naive CD4 responses: impact on effector generation and memory development. *Springer Semin Immunopathol*. 2002;24(1):53–60.
145. Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol*. 1998;64(6):703–12.
146. Karakike E, Moreno C, Gustot T. Infections in severe alcoholic hepatitis. *Ann Gastroenterol*. 2017;30(2):152–60.
147. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, et al. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care*. 2014;18(3):R130.

148. Xu W, Flick T, Mitchel J, Knowles C, Ault K. Cocaine effects on immunocompetent cells: an observation of in vitro cocaine exposure. *Int J Immunopharmacol.* 1999;21(7):463–72.
149. Kubera M, Filip M, Basta-Kaim A, Nowak E, Siwanowicz J, Zajicova A, et al. The effect of cocaine sensitization on mouse immunoreactivity. *Eur J Pharmacol.* 2004;483(2–3):309–15.
150. Ruiz P, Berho M, Steele BW, Hao L. Peripheral human T lymphocyte maintenance of immune functional capacity and phenotypic characteristics following in vivo cocaine exposure. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;88(3):271–6.
151. Chao C, Jacobson LP, Tashkin D, Martínez-Maza O, Roth MD, Margolick JB, et al. Recreational drug use and T lymphocyte subpopulations in HIV-uninfected and HIV-infected men. *Drug Alcohol Depend.* 2008;94(1–3):165–71.
152. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet.* 2011;378(9791):571–83.
153. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013;57(4):1333–42.
154. Xie D, Hai B, Xie X, Liu L, Ayello J, Ma X, et al. Peripheral CD4+CD8+ cells are the activated T cells expressed granzyme B (GrB), Foxp3, interleukin 17 (IL-17), at higher levels in Th1/Th2 cytokines. *Cell Immunol.* 2009;259(2):157–64.
155. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):2–3.
156. Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr.* 2010;5(2):141–7.
157. Kishore R, McMullen MR, Cocuzzi E, Nagy LE. Lipopolysaccharide-mediated

- signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comp Hepatol.* 2004;3 Suppl 1:S31.
158. Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27 Suppl 2:89–93.
159. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1572–85.
160. Zuluaga P, Sanvisens A, Teniente A, Fuster D, Tor J, Martínez-Cáceres E, et al. Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders. *Drug Alcohol Depend.* 2016;162:124–9.
161. Schaberg T, Theilacker C, Nitschke OT, Lode H. Lymphocyte subsets in peripheral blood and smoking habits. *Lung.* 1997;175(6):387–94.