



SECRETARÍA GENERAL
DE SANIDAD

DELEGACIÓN DEL
GOBIERNO PARA
EL PLAN NACIONAL
SOBRE DROGAS

ANEXO IV

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL X

Número Expediente: 2007/020

Investigador Principal: F. Javier Laso Guzmán

Otros Investigadores: Isabel J. Pastor Encinas, Aurelio Fuertes Martín, Alberto Orfao Da Matos, Julia Almeida Parra, Martín Pérez Andrés, María Ángeles Polvorosa Gómez

Título Proyecto o subproyecto: Esteatohepatitis alcohólica: estudio secuencial de los perfiles de secreción de citocinas proinflamatorias e inmunomoduladoras.

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo: Sanidad de Castilla y León

Centro: Hospital Universitario de Salamanca

Departamento: Medicina Interna

Comunidad Autónoma: Castilla y León

Duración: 3 años

Fecha de inicio: 8 de Octubre de 2007

Fecha de finalización: 8 de octubre de 2010

Año Convocatoria: 2007

Área Temática: Medicina Clínica

Palabras Clave: Alcohol, alcoholismo crónico, esteatohepatitis, respuesta inmune, citocinas

RESUMEN: (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras.)

Objetivo: Analizar en el alcoholismo crónico, y especialmente en la esteatohepatitis alcohólica (EHA), las alteraciones inmunofenotípicas y la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de células presentadoras de antígeno (monocitos y células dendríticas), y determinar el comportamiento de las poblaciones linfoides inmunorreguladoras y citotóxicas.

Diseño: Estudio prospectivo de pacientes con alcoholismo crónico y EHA.

Ámbito de estudio: Área de Salud de la provincia de Salamanca (cobertura: 300.000 habitantes).

Sujetos de Estudio: Tres grupos: a) Alcohólicos crónicos sin hepatopatía (ACSH), pero con alcoholismo activo en el momento de ser evaluados (n=16); b) EHA (n=20); c) Grupo control, constituido por individuos sanos con un consumo de alcohol < 20 g/día (n=10).

Instrumentación: Extracción de muestras de sangre periférica para analizar la distribución, inmunofenotipo y perfil secretor de citocinas proinflamatorias por monocitos y células dendríticas, la distribución de subpoblaciones linfoides T y B, e incubación de dichas muestras con células HepG2 y subsiguiente análisis "in vitro" de apoptosis.

Resultados: Aunque el número de monocitos y células dendríticas (global y de las subpoblaciones dendríticas mieloides, derivadas de monocitos y plasmocitoides) en los grupos ACSH y EHA fue similar al obtenido en el grupo control, la secreción espontánea ("ex vivo") de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-12 y TNF alfa por dichas poblaciones celulares fue significativamente más alta. Además, en los pacientes con EHA este trastorno era persistente 3 meses más tarde y se asociaba con un descenso del número de linfocitos T reguladores (Treg) CD4+/CD25+/-/CD27+/- . Asimismo, se observó un incremento de inducción de apoptosis en células HepG2 al incubarlas con sangre periférica de pacientes alcohólicos.

Conclusiones: Nuestros resultados indican la existencia en el alcoholismo crónico de una activación de la respuesta inmune innata, probablemente relacionada con un defecto de la función inmunomoduladora de los linfocitos Treg, asociado con fenómenos de citotoxicidad y apoptosis hepatocitaria.

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:

(Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos).

1. Polvorosa M, Almeida J, Méndez C, Flores J, Pérez M, Pastor I, Orfao A, Laso FJ. Defecto de células T reguladoras en el alcoholismo crónico. Rev Clin Esp 2009; 209: 13. Comunicación a la Mesa Redonda "Alcohol y Sistema Inmune". XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Valencia, 2009.
2. Laso FJ. M.D., Almeida J, 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: 876-85.
3. Polvorosa M, Almeida J, González-Quintela, Orfao A, Laso FJ. Defecto de linfocitos T reguladores en pacientes alcohólicos con esteatohepatitis alcohólica. Rev Clin Esp; 2010: 210: 426-7. Comunicación al XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna y 2º Congreso Ibérico de Medicina Interna. Oviedo, 2010.
4. Polvorosa M, Almeida J, González-Quintela, Marcos M, Orfao A, Laso FJ. Decrease of peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with alcoholic steatohepatitis. EASL Monothematic Conference on "Alcoholic Liver Disease". Atenas, 2010.

MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO SOBRE LOS PROYECTADOS Y SU JUSTIFICACIÓN:

Las modificaciones metodológicas del Proyecto han sido:

1) Estudio de nuevas subpoblaciones linfoides B, determinantes de la respuesta humoral. En la figura 1 se muestra un ejemplo ilustrativo del análisis citológico multiparamétrico realizado, cuyos resultados concretos en los diversos grupos de estudio se aportan en el siguiente apartado de esta Memoria.

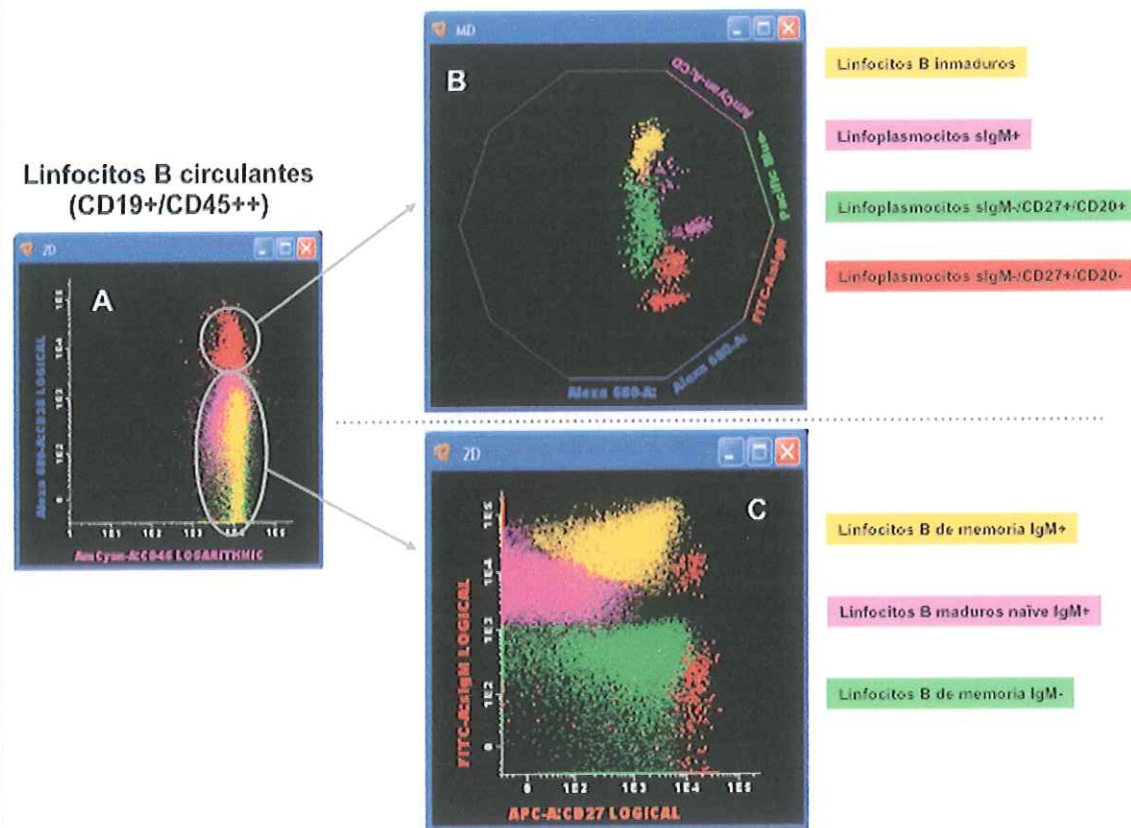


Fig. 1. Ejemplo ilustrativo del análisis mediante citometría de flujo de las subpoblaciones linfoides B presentes en la sangre periférica de un adulto sano no bebedor. Solo están representados los linfocitos B (CD19+/CD45++), dentro de los cuales se identifican dos fracciones celulares en función de su expresión de CD38 (panel A). Entre las células B que expresan este marcador de forma fuerte, se identifican los linfocitos B inmaduros y tres subpoblaciones de linfoplasmocitos (panel B), mientras que dentro del grupo de células B que expresan CD38 de forma débil y heterogénea se incluyen los linfocitos B maduros vírgenes (naive) IgM y distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria (panel C).

2) Estudio in vitro de apoptosis de hepatocitos, con objeto de conocer la intervención de poblaciones linfoides citotóxicas en el desarrollo de lesión y muerte celular asociados con el consumo de alcohol y, por tanto, en la esteatohepatitis alcohólica. Este estudio fue complementario de otro iniciado previamente en el que se habían determinado las características inmunofenotípicas de dichas células citotóxicas. Se evaluó la inducción "in vitro" de apoptosis en células HepG2, una línea celular derivada del hepatocarcinoma, que se mezclaron con sangre periférica lisada de hematíes de la muestra objeto de estudio y se incubaron durante 2, 4, 12 y 24 horas. Después de cada período de incubación se recuperaron las células del cultivo y se marcaron con los anticuerpos monoclonales CD11b y CD45. Tras el marcaje de los antígenos de membrana, las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-APO2.7. La lectura y análisis de las muestras se realizaron en un citómetro de flujo y las células HepG2 se identificaron por sus características típicas de tamaño y granularidad, conjuntamente con la ausencia de expresión de CD11b y CD45. En las

células HepG2 así identificadas se evaluó la apoptosis calculando el canal medio de fluorescencia de APO2.7.

3) Análisis de linfocitos T reguladores (Treg), cuyo comportamiento en el alcoholismo es desconocido. En efecto, aparte de las citocinas de patrón Th1 y Th2, que ya han sido analizadas previamente por nuestro grupo de investigación en pacientes alcohólicos (Laso et al, Alcohol clín exp res 1999; 23: 1306-11), en la actualidad cobra gran relevancia el papel inmunomodulador de determinadas poblaciones linfoides Treg, en particular las que expresan en su membrana las moléculas FOXP3 o CD25, que actúan inhibiendo las respuestas inmunitarias y favoreciendo el mantenimiento de la autotolerancia (Jung et al; Immunobiology 2009; 214: 291-302). Dado que el análisis de la subpoblación Treg FOXP3+ presenta cierta complejidad metodológica y que existe una estrecha correlación entre la expresión de FOXP3+ y la de CD25, optamos por estudiar el comportamiento de la población linfocite Treg CD4+/CD25++/CD127+/- . El análisis se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica, con combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD3, CD4, CD8, CD25, CD45, CD45Ra, CD127 y CD197 (CCR7), con el fin de identificar los linfocitos Treg CD4+/CD25++/CD127+/- y sus subpoblaciones en estadios virgen (CD54RA-/CCR7-) y efector (CD45RA-/CCR7+). En la figura 2 se expresa la identificación por citometría de flujo de esta subpoblación celular y en el siguiente apartado de esta Memoria se detallan los resultados obtenidos en nuestro estudio.

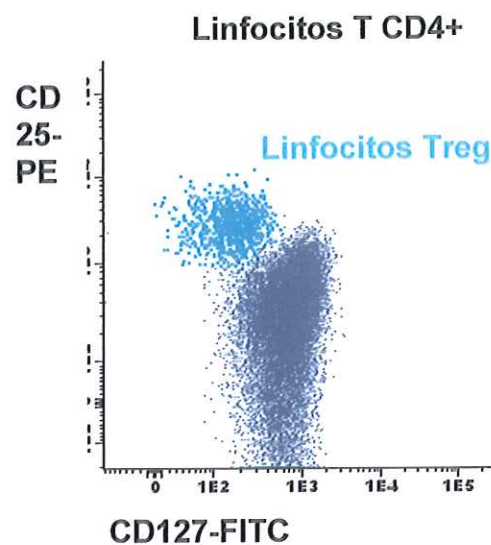


Fig. 2. Identificación por citometría de flujo de los linfocitos Treg CD4+/CD25++/CD127+/-

Como se indicó reiteradamente en las memorias anuales del Proyecto, hay que destacar las dificultades surgidas para el reclutamiento de pacientes con esteatohepatitis alcohólica que cumplieren los criterios exigidos en nuestro estudio, lo que ha retrasado el desarrollo temporal del estudio. Finalmente, hemos podido alcanzar el número de esteatohepatitis previsto en el Proyecto incorporando muestras de sangre de pacientes ingresados en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, obtenidas por el colaborador científico del presente Proyecto, el Dr. Arturo González Quintela.

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

1. Estudiar por primera vez en la esteatohepatitis alcohólica el comportamiento de células dendríticas monocitos, tanto desde el punto de vista del inmunofenotipo como funcional (perfil secretor de citocinas proinflamatorias)
2. Valorar la secreción por linfocitos T de citocinas inmunomoduladoras Th-1 y Th-2 en dicha patología
3. Conocer el comportamiento evolutivo de la esteatohepatitis alcohólica desde el punto de vista de la respuesta inmune, teniendo en cuenta el estado de ingesta alcohólica

OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto).

1. Se analizó la distribución en sangre periférica de monocitos y distintas subpoblaciones de células dendríticas (mieloides: CD33+++; derivadas de monocitos: CD33+/CD16+; y plasmocitoides: CD33-/d), así como la producción de citocinas proinflamatorias por dichas células, en condiciones basales y tras estimularlas con interferón gamma y lipopolisacárido. El número de monocitos y de células dendríticas (tanto su conjunto como las diversas subpoblaciones) de los pacientes con esteatohepatitis alcohólica y de los alcohólicos sin hepatopatía fue similar al de los sujetos del grupo control (Tabla 1).

	Controles (n= 10)	ACSH (n= 16)	EHA (n=20)
Leucocitos	6298±1747	6904±1804	8162±3666
Monocitos	517±218	642±213	612±319
Células dendríticas totales	63±25	65±33	70±47
Dendríticas mieloides (CD33 ⁺⁺⁺)	10 ±3	8.4±5	8.1±5,7
Dendríticas CD16+ (CD33 ⁺⁺)	43±25	43±24	54±39
Dendríticas plasmocitoides (CD33 ^{lo/})	9±3	8±7	10,8±6,9

Tabla 1. Leucocitos, monocitos y células dendríticas en la sangre periférica de los pacientes alcohólicos crónicos y de los individuos del grupo control. Los valores se expresan en media \pm desviación estándar del número absoluto de cada población celular/mm³. ACSH: alcohólicos crónicos sin hepatopatía; EHA: esteatohepatitis alcohólica

Al evaluar el perfil secretor de citocinas proinflamatorias, se constató una secreción espontánea ("ex vivo") significativamente más alta de IL-1, IL-6, IL-12 y TNF alfa por monocitos (Fig. 3) y células dendríticas derivadas de monocitos y dendríticas mieloides (Figs. 4 y 5) en el grupo de pacientes con esteatohepatitis y en los alcohólicos sin hepatopatía asociada. En condiciones de estimulación celular, la producción de citocinas proinflamatorias en los pacientes alcohólicos fue significativamente superior a la observada en condiciones basales, especialmente en lo que se refiere a TNF alfa (Fig. 6)

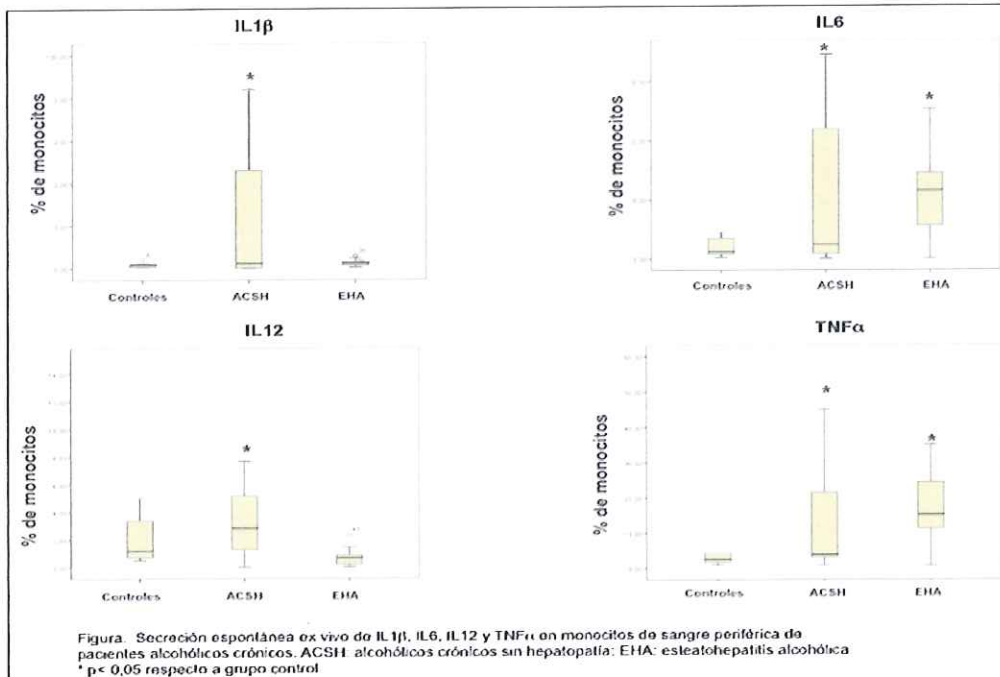


Fig. 3

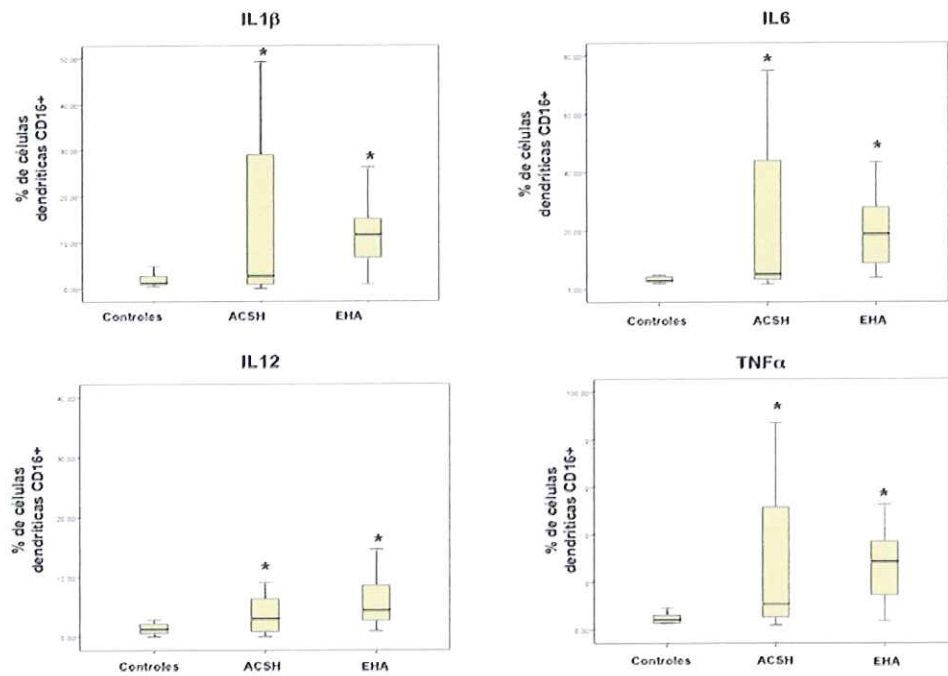


Fig. 4

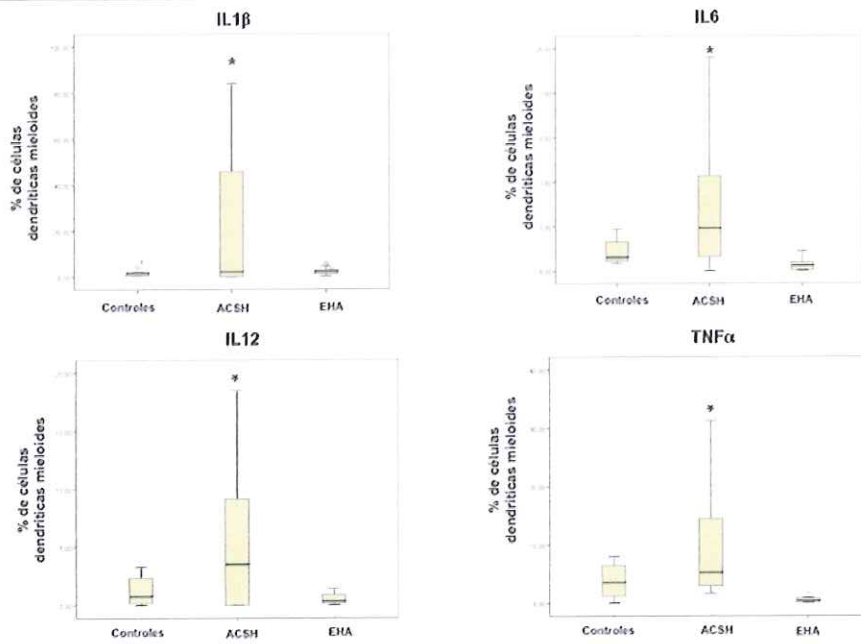


Figura. Secreción espontánea ex vivo de IL1 β , IL6, IL12 y TNF α en células dendríticas mieloides de sangre periférica de pacientes alcohólicos crónicos. ACSH: alcohólicos crónicos sin hepato patía; EHA: esteatohepatitis alcohólica * p < 0,05 respecto a grupo control

Fig. 5

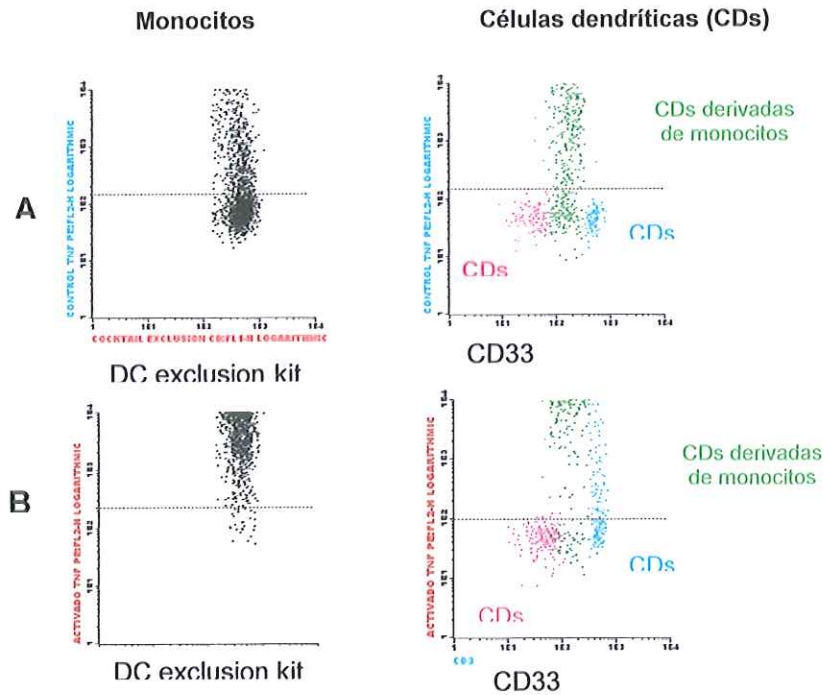


Fig. 6. Secreción espontánea (A) y tras estimulación in vitro (B) de TNF alfa por monocitos y distintas subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica de un paciente con esteatohepatitis alcohólica.

Estos hallazgos confirman la existencia de una activación de la respuesta inmune innata lo que predispone a estos últimos al desarrollo de lesión y muerte celular. Para valorar este aspecto concreto, realizamos un estudio complementario en un reducido grupo de pacientes alcohólicos sin lesión hepática (n=6) consistente en un análisis de inducción de apoptosis "in vitro" en la línea celular HepG2, proveniente de hepatocarcinoma. A las 2, 4, 12 y 24 de incubación de la sangre periférica de los pacientes con dichas células diana se observó un significativo incremento con respecto a los individuos control ($p < 0,05$) de la expresión del marcador de apoptosis APO2.7 en las células HepG2.

En contraste con la activación de la respuesta inflamatoria, en los pacientes con esteatohepatitis alcohólica y en los pacientes alcohólicos sin lesión hepática asociada se observó un defecto de la respuesta inmune humoral. Así, en ambos grupos de pacientes se constató un descenso significativo ($p < 0,05$) del número de linfocitos B, y el predominio de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en la inmunoglobulina que secretan, especialmente las propias de una respuesta secundaria de anticuerpos (inmunoglobulinas diferentes a IgM, en particular IgA), como indicador de un contacto previo y sostenido con antígenos. En cuanto a los linfoplasmocitos (plasmablastos), en los pacientes con esteatohepatitis alcohólica dichas células secretaban preferentemente IgM (respuesta primaria de anticuerpos), probablemente por el estímulo antigénico agudo existente en esa situación (Fig. 7).

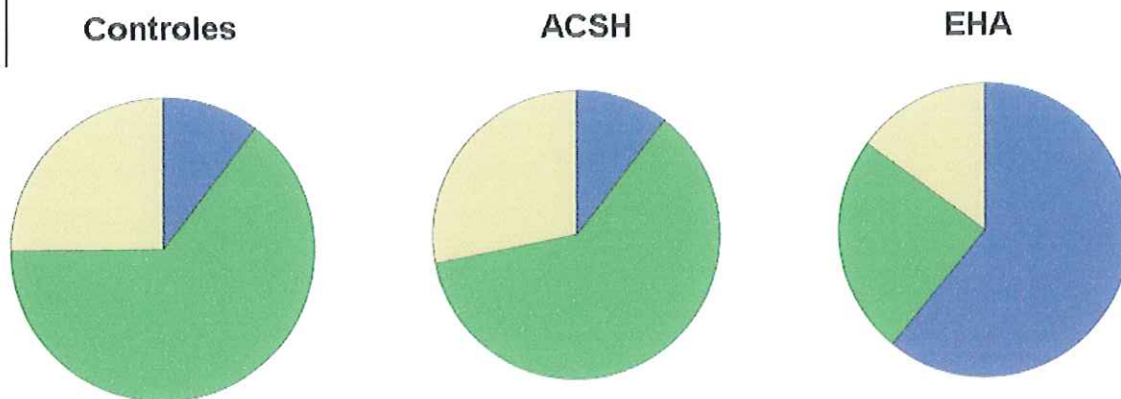


Fig. 7. Porcentaje de linfoplasmocitos (plasmablastos) secretores de IgG (amarillo), IgA (verde) e IgM (azul). ACSH: alcohólicos crónicos sin hepatopatía, EHA: esteatohepatitis alcohólica.

2. De acuerdo con las modificaciones metodológicas antes expuestas, analizamos el comportamiento de la subpoblación linfocítica Treg CD4⁺/CD25⁺/CD127⁻, observando en los pacientes con esteatohepatitis alcohólica un descenso significativo de las mismas ($p < 0,05$) en comparación con alcohólicos crónicos sin hepatopatía y con los controles, tanto en números absolutos como en porcentaje de células Treg con respecto al total de leucocitos (Fig. 8). El descenso observado en los pacientes con esteatohepatitis era preferentemente a expensas de la población de células Treg de memoria/efectoras. (Fig. 8). Los resultados de este estudio ponen de manifiesto por primera vez la existencia de un defecto numérico de los linfocitos Treg circulantes en la esteatohepatitis alcohólica. Teniendo en cuenta el papel inhibitorio de la respuesta inmune de los linfocitos Treg, este trastorno podría contribuir a la activación de la respuesta inmune innata referida en el epígrafe anterior y al desarrollo de hepatopatía por alcohol. Son necesarios nuevos estudios para profundizar en este hallazgo novedoso y conocer mejor sus repercusiones.

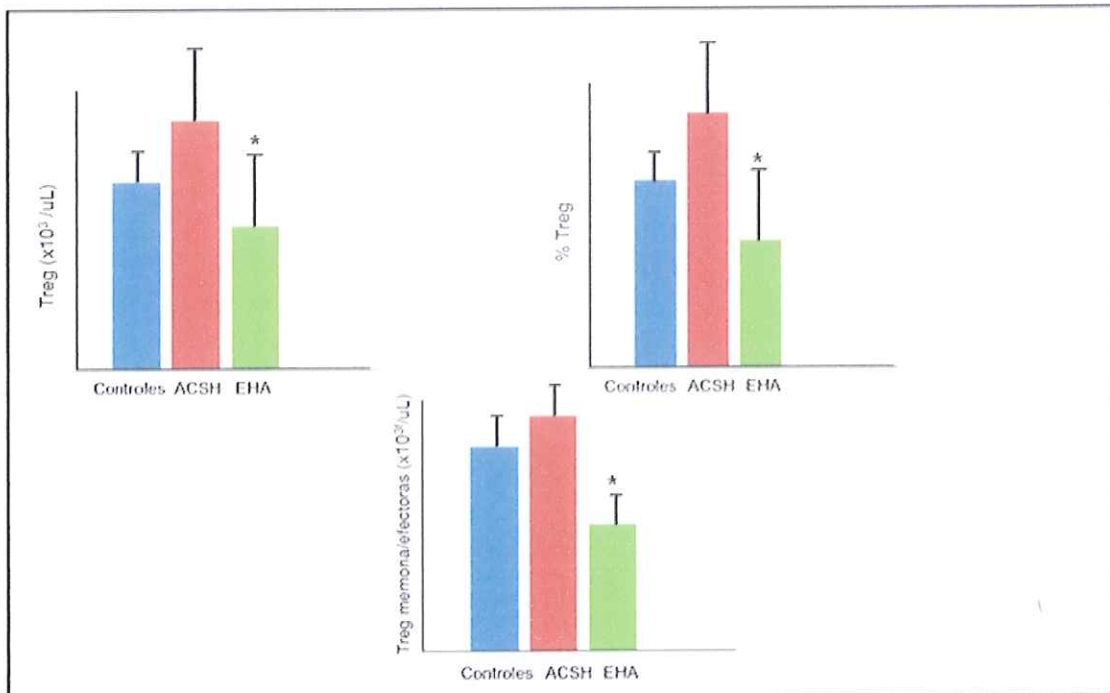


Fig. 8 Número y porcentaje de células T reguladoras (Treg) en pacientes con alcoholismo crónico. ACSH: alcohólicos crónicos sin hepatopatía; EHA: esteatohepatitis alcohólica. * p < 0,05 respecto a grupo control y alcohólicos con EHA

3. De los 20 pacientes con esteatohepatitis incluidos en el estudio, hemos podido reevaluar 15. De ellos, 13 se hallaban en abstinencia de alcohol a los 3 meses del estudio inmunológico inicial, y los 2 restantes seguían con ingesta etílica activa. En los pacientes abstinentes se repitió el análisis de la secreción espontánea (“ex vivo”) de IL-1, IL-6, IL-12 y TNF alfa por monocitos y células dendríticas, y los resultados fueron similares a los obtenidos en la determinación realizada durante la fase aguda de esteatohepatitis. Esta activación persistente de la respuesta inflamatoria también se ha descrito por nuestro grupo en células citotóxicas de pacientes que habían presentado 3 meses antes una esteatohepatitis alcohólica (Laso et al, Alcohol clin exp res 1997; 21: 672-6) y sugieren la permanencia del estímulo antigénico (probablemente el lipopolisacárido que accede a la circulación general por el aumento de permeabilidad intestinal inducida por el etanol).

APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS. (En caso de memoria final)

La activación de la respuesta inmune innata en el alcoholismo y en la esteatohepatitis alcohólica constituye una base teórica sólida para considerar el uso de fármacos inmunomoduladores en la hepatopatía alcohólica.

Salamanca, 2 de diciembre de 2010

FIRMA

F. Javier Laso Guzmán