



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR DEL CÁNCER**

**Análisis de la respuesta inflamatoria
mediada por receptores tipo *toll* tras el
consumo intensivo de alcohol o *binge
drinking***

Tesis doctoral

Pilar Costa Alba

2016

D. FRANCISCO JAVIER LASO GUZMÁN, CATEDRÁTICO DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

D. MIGUEL MARCOS MARTÍN, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO
DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

D. ANTONIO JAVIER CHAMORRO FERNÁNDEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Análisis de la respuesta inflamatoria mediada por receptores tipo *toll* tras el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking***” que presenta Dña. Pilar Costa Alba ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, originalidad y contenido suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en

Salamanca a 13 de julio 2016.

Prof. Dr. F. J. Laso
Guzmán

Prof. Dr. M. Marcos Martín

Prof. Dr. A. J. Chamorro
Fernández

A Julio y a Sergio.

A mis padres y mi hermano.

*“No existe falta de tiempo, existe falta de interés,
porque cuando la gente realmente quiere,
la madrugada se vuelve día, el martes se vuelve sábado
y un momento se convierte en oportunidad”.*

Esta tesis doctoral, resume 4 años de esfuerzo, trabajo y aprendizaje, a la vez que enriquecimiento personal y profesional. Como en todo, ha habido momentos duros pero también buenos ratos, pero todos han merecido la pena. Ha servido para darme cuenta de la cantidad de gente que me ha apoyado, ayudado y animado, y por ese motivo, me gustaría expresar mi enorme agradecimiento a aquellas personas que de un modo u otro, han contribuido a conseguir uno de mis sueños, ser doctora.

Al Dr. Miguel Marcos Martín, Miguel, mi jefe de mesa, mi compañero, mi amigo y ahora mi director de tesis. Esa persona con una mente privilegiada que saliendo un día de guardia, esbozó un proyecto y que tras 4 años de trabajo, aquí presentamos. Su dedicación, su esfuerzo, su capacidad de dirección y su gran paciencia, han logrado que esa idea se hiciese realidad. Gracias por estar ahí en todo momento Miguel.

Al Prof. Francisco Javier Laso Guzmán, quien, sin pertenecer a su servicio, me ha dado la oportunidad de participar en un proyecto tan importante, me ha apoyado, animado, además de darme buenas ideas y consejos, que me servirán para continuar, o por lo menos internar, una labor investigadora.

Al Prof. Antonio Javier Chamorro Fernández, por sus enseñanzas y explicaciones necesarias para la realización de este proyecto, por su paciencia y por sus palabras de ánimo que sirvieron como pequeños empujones para seguir adelante.

Al Dr. Jorge Luis Torres Triana, que en la sombra, me ha ayudado en aquella parte que para mí era más difícil de realzar y comprender y que por tanto, ha sido fundamental.

A la Dra. Consuelo Guerri, a la Dra. María Pascual, y al resto de su equipo de investigación, por su aportación en la realización de este proyecto.

A M^a Ángeles Pérez, por enseñarme pacientemente la realización la técnica de PCR y pasar buenos momentos en el laboratorio.

A Isabel, Marta, Cristina, Javi, Violi, Agustín, Isabel C.,... a todos mis compañeros del Servicio de Urgencias que de una forma u otra, han contribuido que pudiese realizar este trabajo.

A los residentes de medicina interna y familia, por ayudarme en esas largas noches de “borrachera”, a recoger muestras de pacientes.

A Julio, mi marido. Gracias por tener tanta paciencia, apoyarme, escucharme y animarme en los momentos difíciles. Gracias por ayudarme en todo lo referente a lo informático, cuando parecía que iba a ser imposible hacerlo, él lo conseguía. Gracias por ser mi sustento.

A mi hijo Sergio, por tener paciencia y por los momentos que me he perdido, y aunque tenga sólo 6 años, por comprender y entender que este proyecto era muy importante para mí y espero que le sirva de ejemplo, de esfuerzo y sacrificio, como tuve yo.

A mis padres. Gracias a vosotros soy lo que soy, he llegado aquí por vuestro esfuerzo, sacrificio y cariño. Espero poder ser, al menos, la mitad de buena madre de cómo habéis sido vosotros con nosotros. Espero que os sintáis orgullosos de mí igual que yo de vosotros.

A mi hermano, el pequeño que ha ayudado a su hermana mayor, también en lo referente al tema informático y que con su gran paciencia ha conseguido que no me desesperase y me ha animado en todo momento.

A mi amiga Teresa. En dos momentos de crisis, ha sabido aconsejarme y ayudarme, y gracias a ello, he seguido adelante. Y por supuesto, por escucharme en los

momentos duros y también en los buenos. Y porque sé que se alegra tanto o más que yo de este trabajo.

A Ana, por su inestimable ayuda y paciencia con la estadística.

A todos mis amigos, que sobre todo en el último año, ha tenido que escucharme continuamente “tesis por aquí...tesis por allá...”. Gracias por vuestro apoyo y ánimo.

INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes históricos	3
Epidemiología del consumo de alcohol.....	5
Situación mundial.....	6
Situación en España.....	9
El fenómeno del “binge drinking” o “consumo intensivo de alcohol”.....	13
Patrones de consumo	13
Concepto e importancia del botellón.....	14
Concepto y relevancia del “binge drinking”	15
Consecuencias del abuso del alcohol.....	20
Patrones de consumo perjudicial de alcohol	20
Morbi-mortalidad asociada al alcohol	21
Coste socioeconómico del consumo de alcohol	23
El alcohol y la respuesta inmune	25
Alteraciones inducidas por el alcohol en la respuesta inmune	25
<i>Alcohol e inmunosupresión</i>	<i>25</i>
<i>Alcohol y respuesta inmune innata.....</i>	<i>26</i>
<i>Respuesta inmune adaptativa y consumo de alcohol</i>	<i>27</i>
Papel fisiopatológico de las vías de señalización a través de receptores de tipo toll (TLR) en el daño inducido por el consumo de alcohol	28

<i>Los receptores de tipo toll</i>	28
<i>El alcohol y la señalización mediada por TLR</i>	32
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
Diseño del estudio	43
Muestra objeto de estudio	43
Casos.....	43
Controles.....	44
Extracción y procesamiento de muestras	46
Cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	47
RT-PCR a partir de ARNm	48
Selección de los genes de referencia	52
Análisis de la expresión génica	53
Transcripción reversa y cuantificación de ARNm por PCR a tiempo real	55
Síntesis de ADNc a partir de ARNm.....	55
Cebadores o <i>primers</i>	56
Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real	56
Cuantificación de las citocinas plasmáticas	58
Métodos estadísticos	59
Financiación	60

RESULTADOS.....	61
Características de la muestra objeto de estudio	63
Expresión de ARNm de TLR en sangre periférica.....	66
Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR1	66
Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR2	67
Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR4	68
Expresión de ARNm de citocinas pro-inflamatorias en sangre periférica.....	71
Expresión del ARNm de TNF- α en sangre periférica	71
Expresión del ARNm de la IL-1 β en sangre periférica	72
Expresión del ARNm de la IL-8 en sangre periférica	73
Niveles en plasma de citocinas y quimiocinas	75
Correlación entre variables	76
Edad y expresión de ARNm del TLR4.....	76
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR1	77
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR2	78
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR4.....	78
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm del TNF- α	79
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de la IL-1 β	80
Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de la IL-8	80
DISCUSIÓN.....	83
Consideraciones metodológicas generales sobre nuestro trabajo	85

Diseño del estudio	85
Obtención y procesamiento de las muestras.....	88
Selección del gen de referencia	89
Optimización de la PCR.....	90
Expresión del ARNm de TLR1 en sangre periférica.....	91
Expresión del ARNm de TLR2 en sangre periférica.....	93
Expresión del ARNm de TLR4 en sangre periférica.....	96
Niveles de ARNm del TLR4	96
Expresión del TLR4 en relación con la edad.....	98
Relación entre la expresión del TLR4 y el sexo.....	99
Expresión de ARNm de citocinas pro-inflamatorias y análisis de citocinas en plasma.....	102
CONCLUSIONES.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos

Los primeros datos de consumo de alcohol los encontramos a finales de la Edad de Piedra al encontrarse restos en vasijas, debido a la fermentación casual que ocurrió por almacenar zumos o cereales malteados¹. En el Antiguo Egipto la vid era el segundo cultivo tras los cereales, por lo que el vino y la cerveza se consumían indistintamente, aunque la cerveza era poco apreciada por las clases sociales elevadas. La cultura griega y romana son grandes consumidoras de vino, incluso tienen un dios al que adoran, Dionisio para los griegos, y su análogo en la época romana, el dios Baco. En la península ibérica durante el dominio árabe desciende el consumo del vino pero aumenta el de la cerveza como aporte calórico y nutriente que sustituye al agua y la comida en épocas de escasez. Durante la Edad Media y según avanza la Reconquista, aumenta de nuevo el consumo de vino ya que aumenta su producción, y éste comienza a formar parte de nuestra dieta habitual.

En el siglo XVI, Lutero encabeza un cambio de pensamiento en el consumo de bebidas alcohólicas calificándolo como “el diablo de la bebida”. Comienzan así las clases altas a repudiar el beber sin medida, a la vez que se introducen bebidas calientes como el café. Sin embargo, en las clases inferiores, el abuso de bebidas alcohólicas hasta el estado de embriaguez se considera como la “alegría de vivir”, por lo que se mantiene².

Tras siglos observando los efectos nocivos del abuso del alcohol, a partir del siglo XIX comienzan a aparecer organizaciones que fomentan la abstinencia. La presión de estas organizaciones alcanza su mayor expresión en EEUU donde se elabora en el siglo XX la llamada “Ley seca”. Estos movimientos se generalizan también por Europa, sobre todo en Gran Bretaña y los países nórdicos. En España, apenas tuvieron

repercusión³ y las bebidas alcohólicas continuaron formando parte de nuestra dieta habitual, fundamentalmente el vino con un patrón de consumo diario y regular.

Epidemiología del consumo de alcohol

El estudio del consumo de alcohol resulta complejo por la dificultad de su estimación precisa, la variedad de formas de consumo y la diversidad de clasificaciones y definiciones al respecto. Todo ello complica el análisis de patrones de consumo y las comparaciones entre datos, así como el estudio de las repercusiones sobre la salud, las posibles intervenciones y sus resultados. En todo caso, para la obtención de información, los principales indicadores existentes de consumo de alcohol son el consumo de alcohol per cápita y las encuestas poblacionales de salud⁴.

El consumo de alcohol per cápita se define como la cantidad de alcohol consumida en litros de alcohol puro en una población en un año y, por tanto, se expresa en litros de etanol puro (global o desglosado por tipo de bebida). Para su cálculo se utiliza como denominador la población en edad de consumo de alcohol, mayor o igual a 15 años, asumiendo la limitación que implica que no se elimina la fracción de los no bebedores.^{4,5} El principal inconveniente de este indicador es que no permite identificar grupos de riesgo y patrones de consumo de alcohol en una población. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica anualmente el consumo per cápita a través del *Global Information System on Alcohol and Health (GISAH)*⁵. En España estos datos se pueden obtener a través del Instituto Nacional de Estadística (INE), La Encuesta Industrial de Productos y el Panel de Consumo Alimentario⁴.

Las encuestas de salud proporcionan información sobre el consumo de alcohol de una nuestra poblacional. Los principales datos que podemos obtener son edad de inicio, frecuencia de consumo, cantidad y promedio de consumo, patrones de consumo (consumo excesivo puntual o *binge drinking*) y preferencia de bebida. En España se viene realizando bienalmente por el Observatorio Español sobre Drogas, la Encuesta

sobre Alcohol y Drogas en población general en España (EDADES), en población de 15 a 64 años, así como la Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES). También se pueden obtener datos en la Encuesta Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad (ENS), y la Encuesta Europea de Salud (EES)⁴.

Situación mundial

A nivel mundial, el consumo medio de alcohol en personas mayores de 15 años es de 6,2 litros puros de alcohol al año, o lo que es lo mismo, casi 5 kg de etanol puro al año o 13,5 gramos al día⁵. La variabilidad entre los países es muy amplia como consecuencia de las características sociodemográficas y culturales de cada región. Los niveles más altos de consumo siguen detectándose en Europa y en América, frente a los más bajos correspondientes a países al sur y al este del Mediterráneo, en los que predomina la religión islámica⁵ (ver figura 1). En Europa, el consumo de alcohol per cápita es de 10-12,4 litros al año⁵ y el porcentaje de mayores de 15 años que consumieron alcohol en el último año es del 64,6%, siendo el 76,9% en varones y el 52,9% en mujeres⁶.

Si diferenciamos entre los patrones de consumo de bebidas alcohólicas, el consumo diario o casi diario de alcohol es más prevalente en los grupos de edades más avanzadas, entre los 55-74 años⁶. El consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* que será definido y tratado posteriormente con más detalle, es más prevalente entre jóvenes con edades comprendidas entre los 15-19 años (11,7% de la población mundial)⁵. Los porcentajes más altos dentro de este patrón de consumo pertenecen a países de la región europea y americana con un porcentaje que varía entre el 20-30% de la población con edades comprendidas entre los 15 y 19 años⁵ (ver figura 2).

En relación con el sexo, los varones superan de forma general a las mujeres en cualquier grupo de edad y patrón de consumo. A nivel mundial, el consumo total de alcohol per cápita en el 2010 en varones y mujeres fue de 21,2 y 8,9 litros puros de alcohol respectivamente⁵. La mayor diferencia la encontramos en la prevalencia de *binge drinking* en donde el ratio varón:mujer es aproximadamente 11:1⁵. También en el consumo a diario o casi a diario de alcohol la prevalencia es mayor en los varones frente a las mujeres.

Geográficamente existen diferencias entre el tipo de bebidas alcohólicas consumidas. Globalmente el 50,1% de las bebidas alcohólicas consumidas corresponden a destilados, que es el tipo de alcohol más frecuente en sureste asiático y región oeste del Pacífico, de acuerdo a la división en regiones de la OMS, mientras que en Europa se sitúa en el segundo lugar. La segunda bebida más consumida es la cerveza, con un 34,8%, siendo la más frecuente en países de la región europea y americana. El vino ocupa el tercer lugar en frecuencia con un 8% del total de bebidas alcohólicas, siendo similar en frecuencia con su consumo en las regiones europeas y americanas⁵.

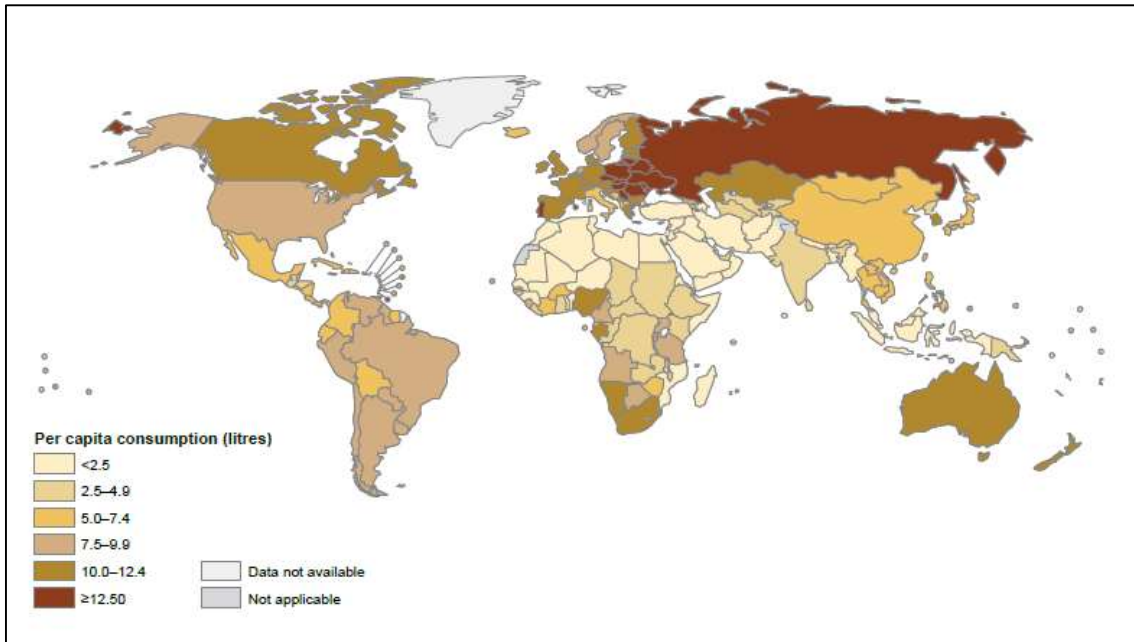


Figura 1: Consumo de alcohol per cápita a nivel mundial. Obtenido de Global status report on alcohol and health- 2014⁵.

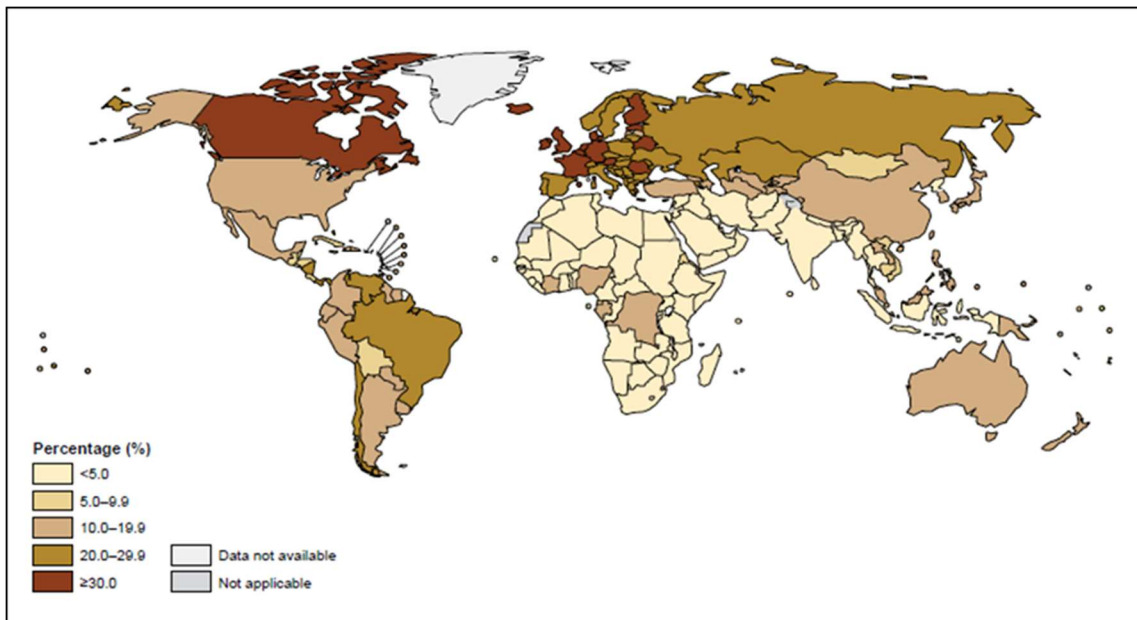


Figura 2: Prevalencia del *binge drinking* entre los 15 y 19 años (%). Obtenido de Global status report on alcohol and health- 2014⁵.

Situación en España

España es uno de los países donde el consumo excesivo de bebidas alcohólicas y sus problemas relacionados adquieren gran importancia ya que, aunque en los últimos años hemos observado el auge de nuevas drogas de diseño, el alcohol sigue siendo la droga más consumida según la última Encuesta Nacional de Salud publicada en 2015. Además, el consumo de alcohol per cápita en mayores de 15 años se encuentra por encima de la media mundial, correspondiendo a 11,2 litros de alcohol puro al año. Este consumo es mayor en varones (15,9 litros) que en mujeres (6,7 litros)⁵.

Así por ello, desde el año 1994 la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, realiza encuestas para conocer la situación del uso de alcohol y drogas tanto en la población general como en población de enseñanzas secundarias. Estos estudios utilizan la misma metodología que otros realizados en países europeos y americanos, permitiendo así su comparación.

La EDADES, se lleva realizando desde el año 1995 de forma bienal, sobre población general en hogares, con edades comprendidas entre los 15 y 64 años. La última encuesta publicada ha sido la correspondiente a los años 2013-2014⁷. En ella podemos observar como el alcohol sigue siendo la droga más consumida por la población general. El 78,3% de la población reconoce haber consumido alcohol en el último año, frente al 40,7% el tabaco y 12,2% los hipnosedantes (segunda y tercera droga, respectivamente) (ver figura 3). El 83,2% de los hombres consumieron alcohol en los últimos 12 meses frente al 73,4% de las mujeres. Destaca además que el 79,1% de la población con edades comprendidas entre los 15-34 años había consumido alcohol en el último año, y de ellos, el 62,2% lo realizaron con edades comprendidas entre 15 y

17 años. Esta encuesta refleja además una edad de inicio media en el consumo de bebidas alcohólicas a los 16 años.

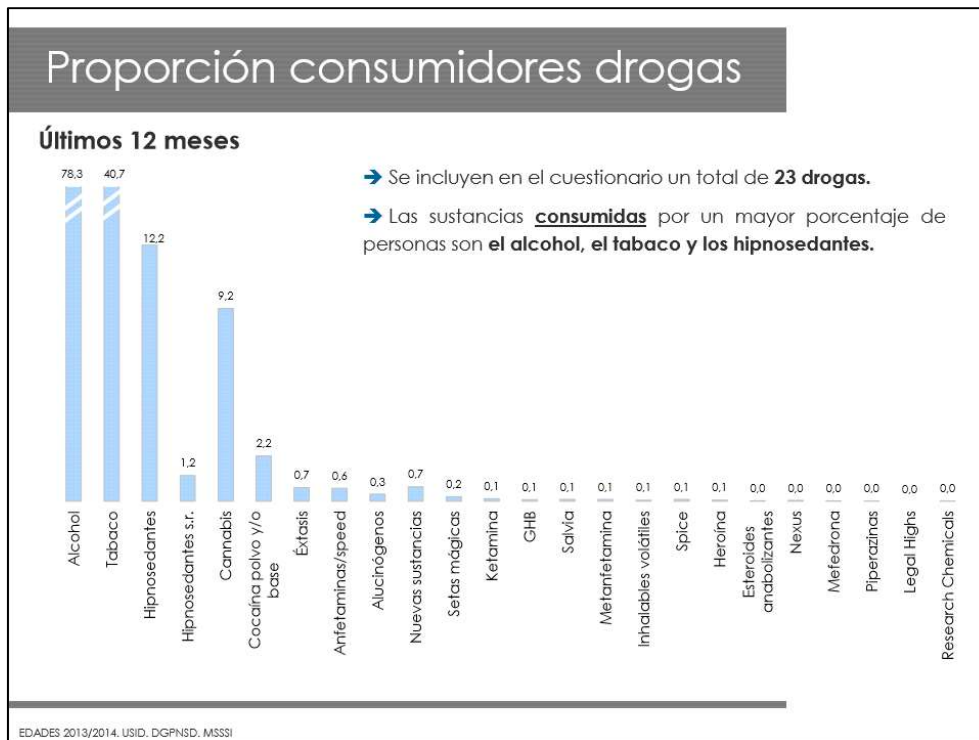


Figura 3: Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2013-2014⁷.

La ESTUDES tiene como objetivo el conocimiento de la situación y tendencia del consumo de drogas en los estudiantes de Enseñanza Secundaria de 14 a 18 años. Según los datos obtenidos en la encuesta realizada en los años 2014-2015, el alcohol es la droga más consumida por los adolescentes, seguido del tabaco y el cannabis aunque es la primera vez que se produce un ligero descenso con respecto a encuestas previas. El 76,8% reconocieron haber consumido alcohol en el último año frente a un 31,4% que admite el consumo de tabaco y el 25,5% de cannabis. Desde el año 2012 se observa un repunte en el consumo de alcohol en edades tempranas, estableciéndose como edad de inicio a los 13,9 años⁸. Este incremento en edades tempranas se produce a expensas de intoxicaciones etílicas agudas⁹. De hecho, más de la mitad de los jóvenes menores de 16

años se ha emborrachado en el último año, de los cuales los el 26% tenían en ese momento 14 años⁸.

La mayoría del consumo de bebidas alcohólicas en menores de 35 años se realiza en forma del fenómeno social llamado “botellón” y en muchas ocasiones va asociado al consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*. La prevalencia más alta de dicho fenómeno se observa en varones de entre 20-24 años y mujeres de la misma edad. En los menores de 17 años el patrón de consumo de alcohol conocido como *binge drinking* se asemeja al de las borracheras⁸. Otro dato relevante y diferente respecto al resto de datos existentes, es que en los menores de 17 años el porcentaje de chicas que se emborrachan o realizan *binge drinking* es superior a los chicos^{8,9}. En edades superiores, el abuso de bebidas alcohólicas sigue siendo superior en los varones (figura 4).

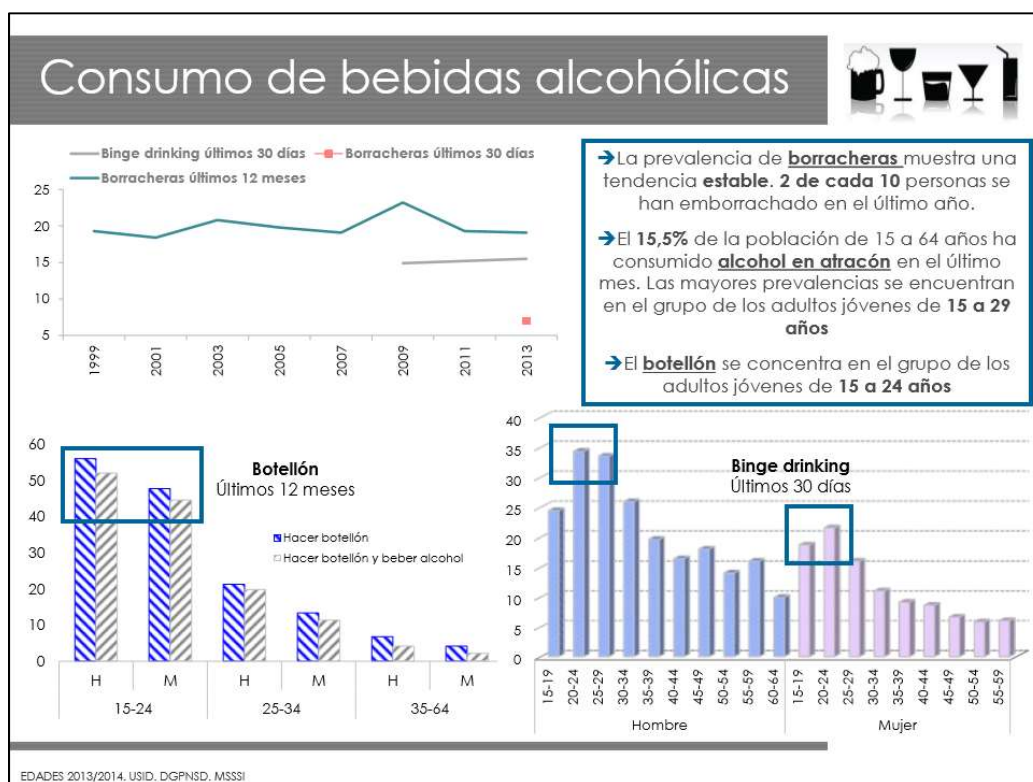


Figura 4: Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2013-2014⁷

Por otro lado, en los últimos años el policonsumo de sustancias ilegales es un patrón cada vez más extendido entre los estudiantes. El 35% de entre 14 y 18 años, reconoce consumir más de una sustancia⁸. El 44,3% de la población mayor de 15 años afirma haber consumido sólo una sustancia ilegal en el último año, dos sustancias el 30,2%, tres sustancias el 9,3%, cuatro el 1,8% y cinco el 0,9%⁷. El denominador común en los policonsumos es el alcohol en forma de *binge drinking*, que actúa como introductor en el consumo de otras sustancias ilegales. Así, el alcohol se asocia sobre todo a cannabis en el 23,2%, seguido de cocaína en el 5,9%, éxtasis u otras drogas de síntesis en el 1,3% y por último anfetaminas o *speed* en el 1,1%⁹.

El fenómeno del “binge drinking” o “consumo intensivo de alcohol”

Patrones de consumo

A lo largo de la historia, y como ya se ha hecho referencia previamente, el alcohol ha formado parte de nuestras vidas, pero su consumo ha ido cambiando según las circunstancias históricas de cada país, región y cultura. Como resultado de todos estos cambios, los patrones de consumo de bebidas alcohólicas clasifican a los países en dos grandes grupos: *wet cultures* y *dry cultures*. En los países calificados como *wet cultures*, el consumo de alcohol está integrado en la vida cotidiana, ya que se consume regularmente en las comidas; las bebidas son de fácil acceso y la proporción de personas abstemias es escasa. El vino es la bebida predominante, siendo esta cultura característica de los países de la cuenca mediterránea. En las regiones con *dry cultures* el alcohol no forma parte de la vida diaria. Se consume más esporádicamente, por lo que la proporción de personas abstemias es mayor, pero al hacerlo es más frecuente que ocurra como intoxicación. El acceso es más restrictivo y las preferencias son las bebidas destiladas y la cerveza. Este patrón es típico de países escandinavos, anglosajones y Canadá¹⁰.

En los últimos estudios realizados, sobre todo en países europeos, se ha observado cómo esta dicotomía va desapareciendo, ya que los patrones de consumo se van homogeneizando. Se generaliza el tipo de bebidas alcohólicas y el consumo de alcohol se hace tanto regularmente como de forma excesiva en una misma ocasión. Estos son los llamados países en transición, en donde se encuentra actualmente España¹¹. Fundamentalmente este cambio de consumo de bebidas alcohólicas destaca en los jóvenes españoles, quienes han adoptado el patrón de los países del norte de Europa llamado *binge drinking* en el que la principal motivación para consumir bebidas

alcohólicas es la búsqueda de la embriaguez¹², adaptándola a las características medioambientales de nuestro país y apareciendo así en nuestro medio lo que se conoce como el fenómeno del “botellón”.

El alcohol en nuestro país siempre ha sido una alternativa de ocio. En los sesenta los jóvenes se reunían en “guateques”, en los setenta en las zonas de vinos y en los ochenta aparece la “movida” y las “litronas”. Es en los noventa cuando los jóvenes comienzan a reunirse en lugares públicos para beber, charlar y relacionarse entre ellos, origen del mencionado “botellón”. La primera referencia sobre este fenómeno aparece en un reportaje del diario El País en 1995, en donde se cita como alternativa de ocio nocturno de los jóvenes en Cáceres frente a los bares, más ruidosos, con precios elevados y ambiente cargado de humo. Los jóvenes deciden salir a la calle para consumir bebidas alcohólicas compradas por ellos mismos sin además límites horarios¹³. Esta nueva práctica se va extendiendo a distintas ciudades universitarias, hasta que se generaliza sin encontrar diferencia entre regiones, ámbito rural o urbano y clases sociales.

Concepto e importancia del botellón

La definición de botellón quedó establecida por A. Baigorri y R. Fernández en el 2003 como una reunión masiva de jóvenes entre 16 y 24 años fundamentalmente, en espacios abiertos de libre acceso, para consumir bebida que han adquirido previamente en comercios, escuchar música y hablar¹³.

El fenómeno del botellón se basa en la creencia central de que consumir alcohol es igual a diversión. La edad de inicio es tan temprana como los 14 años, después de haber probado las bebidas alcohólicas¹². Los que participan, refieren hacerlo para divertirse, así lo reflejan el 34,9% de los encuestados, o para mejorar las relaciones con

otros chicos o chicas (11,9%), para hacer cosas que no haría en otras circunstancias (8,3%), para ligar (8,2%) o por un sentido gregario (“porque lo hacen mis amigos”) (7,8%)¹⁴. Cuando se les pregunta si conocen el riesgo que están asumiendo con esta práctica, los jóvenes sólo son conscientes de las consecuencias agradables a corto plazo, a pesar de que muchos de ellos han experimentado efectos orgánicos desagradables. Además, las encuestas reflejan que el consumo de alcohol de esta forma es bastante inocuo y que lo que realmente produce problemas es su consumo a diario, entre semana¹².

La práctica del botellón plantea un problema social y de convivencia. En aquellos lugares públicos donde se reúnen los jóvenes se generan residuos del consumo de bebidas y alimentos, vandalismo, con daños en el mobiliario urbano y sensación de inseguridad ciudadana teniendo que intervenir dispositivos policiales y otros, por lo que las zonas en las que habitualmente se realiza el botellón tienden a ser abandonadas por sus habitantes habituales¹⁵. Desde el punto de vista médico, el trinomio noche-juventud-alcohol provoca problemas individuales como deterioro del rendimiento laboral, daños cerebrales, accidentes de tráfico, suicidios, además de daños a terceros como violencia interpersonal y agresiones sexuales^{15,16}.

El problema fundamental del botellón es que no sólo es un fenómeno social en el que jóvenes se reúnen para divertirse y consumir bebidas alcohólicas, si no que la forma en que se consume ese alcohol es de forma abusiva y en periodos cortos de tiempo. En la literatura anglosajona es lo que se conoce como “*binge drinking*”.

Concepto y relevancia del “*binge drinking*”

El término “*binge*” o atracón, fue utilizado por primera vez por Tomosovic en 1974, haciendo referencia a periodos de atracones de alcohol seguidos de periodos de

abstinencia en pacientes alcohólicos¹⁷. En la década de los setenta se introduce por primera vez el término *binge drinking* en el proyecto llamado “*Monitoring the future study*” en donde se describe el consumo de alcohol en grandes cantidades, pero en un corto periodo de tiempo, por jóvenes con edades comprendidas entre los 18 y 24 años. A partir de este momento, el concepto de *binge drinking* ha generado numerosos términos y definiciones para un mismo concepto. En la literatura anglosajona podemos encontrar indistintamente el término *heavy episodic drinking*, *heavy sessional drinking*, *risky single-occasion drinking* o *binge drinking*^{18,19}, aunque éste último es el más utilizado. En España, la primera Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en el 2007, ha establecido como término de referencia el de consumo intensivo de alcohol (CIA)¹⁹.

Una definición adecuada de *binge drinking* o CIA, debe integrar cantidad de alcohol ingerida, frecuencia de dichos episodios^{17,19} y consecuencias negativas asociadas^{18,19}. En los años 90 Wechsler y cols²⁰., a través de su estudio realizado en universitarios, establece que los varones a partir de 5 bebidas por ocasión y las mujeres a partir de 4 bebidas, muestran de forma significativa problemas relacionados con el alcohol. Además, al definir el término *binge drinking*, hacen hincapié en la forma de beber alcohol compulsivamente y de forma ocasional, queriéndolo diferenciar del alcoholismo crónico^{17,20}. Pero este umbral es cuestionado por otros autores, como White y cols²¹, quienes describieron que los estudiantes universitarios que más consecuencias negativas habían experimentado al consumir alcohol, lo habían hecho por encima de dichos valores de referencia, concretamente 10 o más bebidas alcohólicas en varones y 8 en mujeres, al menos una vez en las dos últimas semanas²¹. Sin embargo estos valores podían confundirse con la definición según la DSM-IV de abuso y/o dependencia. Por

este motivo se consensuó tomar definitivamente como referencia el umbral establecido por los trabajos de Wechsler^{19,20}.

Otra consideración a tener en cuenta en la conceptualización de *binge drinking* o CIA, es la definición de unidad de bebida estándar (UBE), ya que la cantidad de etanol puro que contiene cada tipo de consumición es diferente según los países. En España, una UBE se ha estandarizado en 10 g de etanol puro y corresponde a un vaso de vino, una caña de cerveza, o medio vaso de bebidas destiladas como whisky o coñac²². Sin embargo países como Reino Unido, Bélgica, Canadá y EEUU entre otros, establecen sus niveles en 8,8 g, 9,9 g, 13,6 g y 14 g, respectivamente¹⁹. En este sentido, en el 2004 el *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) aboga por determinar la concentración de alcohol en sangre (BAC, del inglés *blood alcohol concentration*) como umbral para determinar este patón de consumo de alcohol. De esta forma se tiene en cuenta la variabilidad interpersonal con respecto al peso corporal, el sexo, el tiempo y la velocidad empleados para llegar a dicho nivel¹⁸. La cifra que se estableció fue de 0,08g/dL. Esto corresponde para un adulto con el consumo de 5 o más bebidas para varones y 4 o más bebidas para mujeres consumidas aproximadamente en 2 horas^{17,19}.

La inclusión del intervalo de tiempo en el que se produce un número determinado de estos episodios, es también necesaria para determinar la prevalencia *binge drinking*. El planteado por Wechsler de 15 días²⁰, infraestimaba dicha prevalencia, según el estudio realizado por Vik y cols^{17,19,23}. El más aceptado es el de 6 meses o 30 días, postulados por Hartley y cols. y Okoro y cols. respectivamente, ya que así se detectan la mayoría de los problemas relacionados con este patrón de consumo de alcohol¹⁷. Estas consecuencias fueron detectadas mediante el test AUDIT, respondido por universitarios que habían sido incluidos en los diferentes estudios¹⁷. Así, para Baer y cols²⁴, la definición de *binge drinking* o CIA, debe incluir la aparición de al menos

tres consecuencias negativas derivadas del consumo de 5 o 6 bebidas alcohólicas al menos una vez al mes.

Debido a la variabilidad en la frecuencia de consumo entre sujetos, es necesario concretar este punto fundamentalmente para diferenciar un patrón que se basa en algo puntual y momentáneo del consumo crónico de alcohol. Por este motivo Wechsler²⁵, en un estudio, definió cuatro grupos de sujetos según la frecuencia de consumo: (1) Abstemios: aquellos que no han consumido alcohol en el último año; (2) No CIA: los que consumieron alcohol en el último año, pero no de forma intensiva en las dos últimas semanas; (3) CIA ocasional: aquellos que han consumido alcohol de forma intensiva una o dos veces en las dos últimas semanas; (4) CIA frecuente: los que han consumido alcohol de forma intensiva tres o más veces en las dos últimas semanas. Un alto porcentaje de los sujetos incluidos en el estudio, se clasificaron como CIA frecuentes, los cuales podrían cumplir criterios según DSM-IV de abuso y/o dependencia. De hecho, estudios posteriores han relacionado este patrón de CIA frecuente durante la adolescencia (más de tres veces en las últimas dos semanas), con un aumento en la probabilidad de desarrollar problemas relacionados con el abuso crónico del alcohol^{19,25}.

La combinación de todas estas variables y de los diferentes criterios aplicados en los múltiples estudios sobre *binge drinking* o CIA, hacen compleja establecer una definición operativa y reconocida globalmente. Por ello la más aceptada en España sería aquel patrón en el que se consumen 6 o más bebidas alcohólicas para varones (60 g de etanol) o de 5 o más para mujeres (50 g), en una única ocasión, en un periodo de dos horas, al menos una vez en los últimos 30 días¹⁹. La NIAAA propone como definición aquel patrón de consumo de alcohol que eleve la concentración de alcohol en sangre a 0,08 g/dL, lo que correspondería con 5 o más bebidas para los varones y 4 o más bebidas para las mujeres, ingeridas en aproximadamente dos horas¹⁷.

La importancia en la actualidad del *binge drinking* o CIA radica en el aumento de su prevalencia en la última década a nivel mundial y el alto coste tanto económico como humano que conlleva derivado de sus consecuencias negativas. En el periodo comprendido entre el 2008-2010, la prevalencia del *binge drinking* en España era del 7,2% de la población adulta, siendo ligeramente superior en varones (10%) que en mujeres (4,2%)²⁶. En la Encuesta Nacional de Salud esos valores se incrementan hasta el 13,4% de la población mayor de 15 años que reconoce haber consumido alcohol de forma intensiva en el último año.²² La frecuencia de los episodios es de 2,3 al mes en varones y de 2 en mujeres. El número de episodios por persona y por año es de 3 en varones y de 2,7 en mujeres²⁶. Este tipo de consumo es más frecuente entre los jóvenes, alcanzando el 8% entre los 15-34 años y descendiendo a la mitad entre los 35-64. Los varones son los que más episodios de CIA realizan con un 7,1% frente al 2,1% de las mujeres²². Por todo ello, la prevención y la intervención en nuestro país sobre la población joven debería de ser una prioridad para las autoridades.

Consecuencias del abuso del alcohol

El consumo de excesivo de alcohol tiene repercusiones sociales y sanitarias como consecuencia tanto del abuso o dependencia de esta sustancia, como de la intoxicación o embriaguez. En las últimas décadas, este consumo excesivo ha sufrido un incremento sobre todo en países desarrollados a expensas del aumento en el volumen medio de alcohol ingerido y en la forma de beber, destacando las borracheras. Por todo ello la OMS declaró en mayo del 2004 el consumo excesivo de alcohol como objetivo prioritario para la acción de todos los países miembros²⁷.

Patrones de consumo perjudicial de alcohol

El consumo nocivo del alcohol se define como el patrón de consumo que está causando daños a la salud del bebedor, ya sean físicos (como la cirrosis hepática, inmunodepresión..) y/o mentales (cuadros depresivos, disminución en la concentración..) y daños a las personas de su entorno y a la sociedad en su conjunto²⁸. La OMS establece a través de los criterios de clasificación internacional de enfermedades (CIE-10)²⁹, tres patrones de consumo de alcohol con consecuencias negativas:

- Consumo de riesgo de alcohol: es aquel en el que los varones ingieren al menos 28 UBE por semana o más de 5 en una ocasión, y para las mujeres, 17 UBE a la semana o más de 4 en una ocasión.
- Consumo perjudicial: es aquel en el que se produce daño psíquico, físico, familiar, social o legal.
- Dependencia alcohólica: se define como un grupo de conductas cognitivas y fenómenos fisiológicos que se desarrollan después del uso repetido de alcohol y

que normalmente incluyen un fuerte deseo de consumir alcohol, dificultades para su control aumentando su tolerancia y persistiendo en su consumo a pesar de las consecuencias perjudiciales, dando mayor prioridad al uso del alcohol que otras actividades y obligaciones²⁸.

Morbi-mortalidad asociada al alcohol

Independientemente del patrón de consumo, el alcohol puede causar de más de 200 enfermedades y lesiones descritas en la *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10) de la OMS²⁸. Entre ellas las principales son:

- *Enfermedad cardiovascular*: la relación entre el consumo de alcohol y los efectos cardiovasculares es compleja. El consumo moderado de alcohol (definido entre tres y nueve UBE por semana) se ha relacionado con una disminución en el riesgo de enfermedad coronaria^{30,31}. Su consumo en exceso, en cambio, produce una variedad de efectos adversos incluyendo insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial y fibrilación auricular.
- *Ictus*: en cantidades bajas, el alcohol posee un efecto protector con respecto al ictus isquémico, pero con dosis elevadas de consumo de alcohol el riesgo de ictus hemorrágico se incrementa³².
- *Diabetes mellitus*: su desarrollo está incrementado en la población con consumo elevado de alcohol³³, mientras que en bebedores moderados el riesgo disminuye³⁴.
- *Cáncer*: existe una gran evidencia acumulada que relaciona directamente el consumo de alcohol con el desarrollo de múltiples cánceres como los de boca, laringe, faringe y estómago³⁵, hepatocelular³⁶, mama³⁷ entre los más destacados.

- *Síndrome alcohólico-fetal*: las consecuencias del consumo de alcohol durante el embarazo incluyen retardo en el crecimiento intrauterino, alteraciones en el sistema nervioso central y alteraciones faciales, además del síndrome de abstinencia en el nacimiento³⁸.
- *Sistema inmune*: los patrones de consumo inadecuado de alcohol se han relacionado con alteraciones en el sistema inmunológico e inmunosupresión, como veremos con más detalle más adelante³⁹.
- *Manifestaciones neurológicas*: demencia o enfermedad de Wernicke-Korsakoff, entre las más frecuentes^{40,41}.
- *Lesiones no intencionales*: como resultado de la pérdida del control del comportamiento produciéndose agresiones, robos, violaciones, accidentes de tráfico, suicidios⁴² y en ocasiones homicidios⁴³.

El resultado actual de lo anteriormente expuesto, es que el alcohol es uno de los principales factores de riesgo de morbilidad, discapacidad y mortalidad en todo el mundo (figura 5), lo que genera un elevado coste socioeconómico. Globalmente, el 5,9% de las muertes en 2012 fueron atribuibles directamente al consumo de alcohol.⁵ La mayor proporción se situaba en la región europea (13,3% de muertes debidas al alcohol), ya que en dicha zona el consumo de alcohol es el más alto con respecto al resto de los países del mundo⁵. En España, en el 2011, se produjeron 23403 muertes directamente relacionadas con el alcohol⁴⁴.

Una parte de la sociedad que en los últimos años se está viendo muy afectada por el consumo de alcohol, son los adolescentes. Aunque globalmente la mayoría están sanos, estudios demuestran que el alcohol es causa de enfermedades que generan pérdidas humanas y costes socioeconómicos. Para ello se ha utilizado como indicador de carga de enfermedad, los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), que se

definen como la suma de los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura y los años perdidos por enfermedad/discapacidad⁴⁵. En 2008 en España, la segunda causa de carga de enfermedad en adolescentes y jóvenes de entre 15 y 29 años, fue el abuso del alcohol, equivalente a 83738 AVAD⁴⁶.

El daño causado por el consumo el CIA o *binge drinking* se ha relacionado estrechamente en los adolescentes con accidentes de tráfico⁴⁷, peleas, agresiones⁴⁸ y conductas sexuales de riesgo, ya que el consumo de alcohol influye en que no se utilicen medidas de protección en las relaciones sexuales, produciéndose embarazos no deseados y contagio de enfermedades de transmisión sexual⁴⁹. Así, el hecho de encontrarse en una situación recreativa, como es para los jóvenes el botellón, en donde el consumo de alcohol es uno de los principales motivos de celebración, potencia también el consumo de diferentes drogas que aumentan dichas alteraciones conductuales, sufriendose en ocasiones abusos sexuales. Además de las alteraciones conductuales, recientes estudios aportan datos del daño que produce dicho patrón de consumo de alcohol sobre el cerebro de los adolescentes, el cual es más vulnerable a los efectos del alcohol que el de los adultos. En concreto, el córtex prefrontal y el hipocampo, sufren anomalías en su desarrollo afectando a procesos como la memoria y funciones visoespaciales que persisten a largo plazo⁵⁰.

Coste socioeconómico del consumo de alcohol

El daño producido por el consumo inadecuado del alcohol no sólo tiene repercusiones a nivel de la salud sino que también provoca costes económicos y daños en la sociedad. De forma directa, el abuso del alcohol incrementa los costes del gasto sanitario derivados de consultas, intervenciones, hospitalizaciones y prescripción de medicamentos. En España, en el 2011, esto supuso aproximadamente el 1% del PIB,

más de 10000 millones de euros⁵¹. Es llamativo que en los últimos años la atención de intoxicaciones etílicas agudas, en adolescentes de entre 15 y 16 años en los servicios de urgencias hospitalarias, se ha incrementado, siendo entre el 0,5-1,1% del conjunto de todas las urgencias atendidas y el 25-49% del total de las intoxicaciones por cualquier sustancia⁵¹.

De forma indirecta, el aumento de coste para la sociedad se produce además por la baja productividad en el trabajo, el absentismo laboral y el desempleo, lo que conlleva a unas menores ganancias y a una pérdida prematura de años de vida laboral⁵.

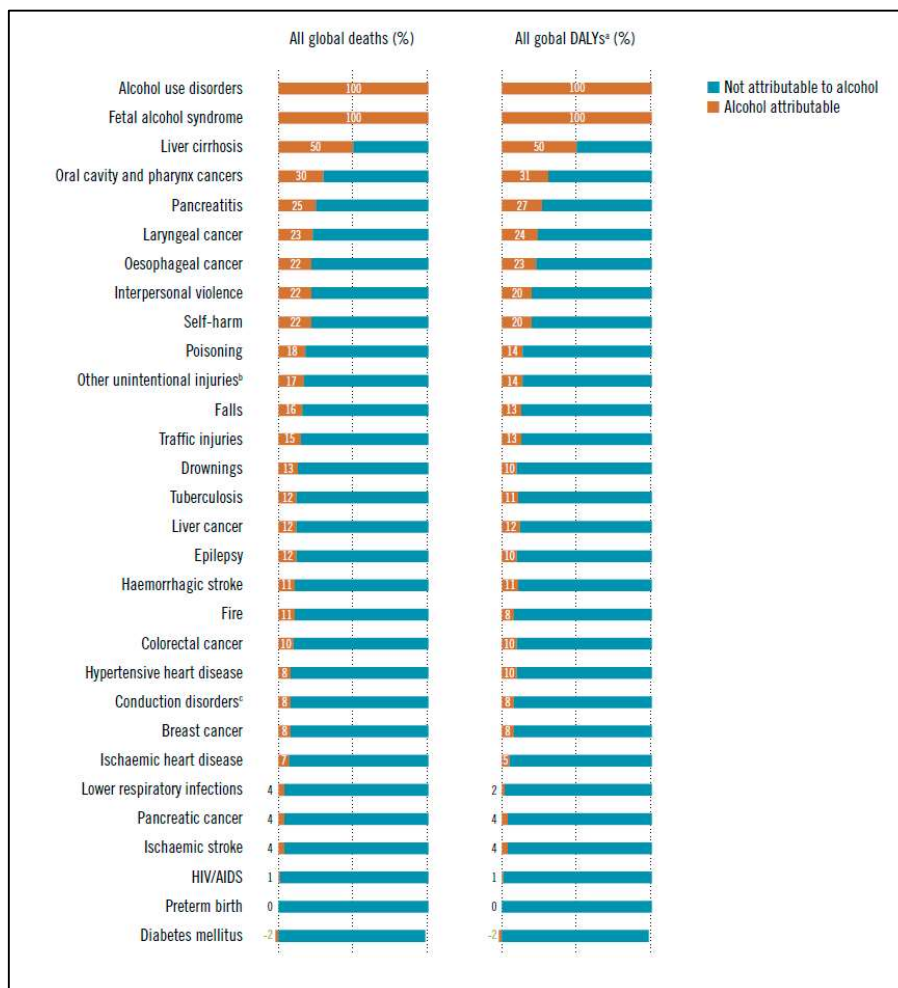


Figura 5: Fracción poblacional atribuible al alcohol (FAP) como causa de muerte, enfermedad y lesión, en 2012. Fuente: Global status report and alcohol and health 2014⁵.

El alcohol y la respuesta inmune

El mecanismo fisiopatológico del consumo del alcohol en la salud humana ha sido ampliamente estudiado desde hace tiempo y no ha conseguido ser completamente esclarecido dada su complejidad. Este efecto depende de diferentes factores, como el patrón de consumo (crónico o agudo/*binge*), la cantidad consumida (moderada o excesiva), el sistema u órgano afectado, y de factores individuales como el sexo o la edad del consumidor⁵². De esta forma, encontramos un amplio espectro de efectos del consumo de alcohol en cada órgano o sistema, de los que, por su interés para el presente trabajo, analizaremos fundamentalmente la acción sobre el sistema inmune.

Alteraciones inducidas por el alcohol en la respuesta inmune

El sistema inmune se encarga de la defensa del organismo frente a diferentes patógenos y está compuesto por mecanismos no específicos, que constituyen el sistema inmune innato, y específicos, que forman por el sistema inmune adquirido o adaptativo⁵³. El sistema inmune innato es la primera barrera defensiva. Su finalidad es reconocer el microorganismo patógeno e intentar frenar y eliminarlo mediante fenómenos de fagocitosis y producción de citocinas inflamatorias, además de activar el sistema inmune adquirido⁵⁴ para que éste produzca anticuerpos específicos frente al patógeno.

Alcohol e inmunosupresión

Existe suficiente evidencia científica que asocia un aumento en la aparición de infecciones con el alcoholismo crónico, justificado por las alteraciones producidas por esta sustancia sobre el sistema inmune, además del estado de malnutrición de estos pacientes⁵⁵. Un ejemplo serían las infecciones respiratorias, ya que en el pulmón, los macrófagos alveolares presentan un estado inflamatorio que favorece paradójicamente

las infecciones por diferentes patógenos intracelulares y además, de mayor gravedad^{53,56}.

Además del efecto del consumo crónico de alcohol sobre el sistema inmune, esta disminución en la capacidad defensiva del organismo se observa también en aquellos pacientes que han sufrido lesiones traumáticas graves y/o grandes quemados que además asociaban estados de intoxicación etílica, y que presentan mayor número de infecciones tanto pulmonares⁵⁷ como sistémicas, frente a politraumatizados o quemados sin intoxicación etílica⁵⁸. Todo ello hace pensar que no sólo el consumo crónico de alcohol puede dañar el sistema inmune, sino que también un consumo agudo e intenso puede producir inmunosupresión^{53,59} aumentándose en ambas situaciones el riesgo de infección⁵⁶.

Alcohol y respuesta inmune innata

El alcohol presenta un importante efecto modulador sobre el sistema inmune, lo que no sólo determina inmunosupresión sino también es capaz de provocar daños en diferentes órganos y tejidos. En el alcoholismo crónico, como se ha demostrado ampliamente, se produce un estado pro-inflamatorio^{53,54,60}, uno de cuyos paradigmas es la hepatopatía alcohólica. Esta activación del sistema inmune en el alcoholismo crónico se debe a que la ingesta de alcohol es capaz de aumentar la permeabilidad de la barrera gastrointestinal, lo que permite el paso del lipopolisacárido (LPS) bacteriano al torrente sanguíneo⁶¹. El etanol y el LPS provocan alteraciones en diversos tipos celulares como las células dendríticas, los neutrófilos, los macrófagos/monocitos, y las células *natural killer*. Por un lado, se produce una activación de las células del sistema monocito/macrófago a través de la activación de receptores de tipo *toll* (TLR), lo que es capaz de incrementar la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α e

IL-8) a través del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Esta activación pro-inflamatoria mediada por TLR está íntimamente ligada al daño tisular como desarrollaremos posteriormente. Entre otras alteraciones, la influencia del alcohol en las células dendríticas determina un incremento en la secreción de IL-10⁶² y una disminución de la IL-12⁶³, lo que repercutirá en el funcionamiento del sistema inmune adaptativo.

Aunque se han estudiado fundamentalmente las alteraciones en el sistema inmune tras el consumo crónico y excesivo de etanol, en el consumo agudo de etanol también hay un incremento de LPS bacteriano en sangre⁶⁴ y, por tanto, una posible respuesta pro-inflamatoria. Sin embargo, además de los datos que apuntan en esta dirección, también hay estudios que han llegado a una conclusión contraria y que han mostrado una disminución en la respuesta inflamatoria tras el consumo agudo de esta sustancia⁶³. Así, en presencia de elevadas concentraciones de alcohol en sangre, se ha detectado una capacidad fagocítica reducida de los macrófagos y neutrófilos⁶⁵, y una menor activación de los mismos, cuyo resultado son niveles de citocinas pro-inflamatorias disminuidas^{53,63}. Por tanto, en el consumo agudo de alcohol existe controversia respecto a si se produce una activación o una disminución en la respuesta pro-inflamatoria⁵⁴.

Respuesta inmune adaptativa y consumo de alcohol

Las alteraciones provocadas por el alcohol en la respuesta inmune adaptativa han sido también estudiadas fundamentalmente tras el consumo crónico de esta sustancia. Así, el alcohol afecta a múltiples tipos celulares, como los linfocitos T reguladores o linfocitos B, cuyo comportamiento en el alcoholismo ha sido descrito previamente^{66,67}. Aunque escapa de los objetivos de este trabajo, podemos mencionar por ejemplo, que los niveles elevados de IL-10 anteriormente mencionados por alteración de la respuesta

inmune inmediata, pueden modificar la diferenciación Th1 y Th2⁵³. Por otro lado, los niveles de inmunoglobulinas también están incrementados, particularmente IgG e IgA lo que indica una disfunción de los linfocitos B^{53,67} que ha sido corroborada por otros trabajos⁶⁷.

Todos estos datos revelan la importancia del alcohol como un potente inmunomodulador⁵³, que afecta tanto al sistema innato como adaptativo y cuyos efectos pueden variar según las diferentes formas de consumo⁵⁴.

Papel fisiopatológico de las vías de señalización a través de receptores de tipo *toll* (TLR) en el daño inducido por el consumo de alcohol

Considerando la importancia del efecto del alcohol sobre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, recientes estudios han demostrado su relación con receptores encargados del reconocimiento de patógenos como los TLR para la producción de una respuesta inflamatoria^{63,68}.

Los receptores de tipo toll

Como hemos mencionado, en la respuesta inmune asociada al consumo de alcohol desempeñan un papel fundamental receptores de la familia de los TLR como los TLR4^{63,68}. Estos receptores forman parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) existentes en la membrana y citosol de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y monocitos/macrófagos) así como otras células como las epiteliales⁶⁹. Entre PRR se incluyen los ya mencionados TLR, los receptores de lectina de tipo C (CLR) o los receptores tipo NOD (NLR). Todas estas moléculas son capaces de reconocer estructuras constantes de la superficie de microorganismos patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP)⁷⁰. La activación

de los PRR por los PAMP pone en marcha distintos procesos propios del sistema inmune innato como la fagocitosis, la opsonización, producción de mediadores de la inflamación y además se establece una conexión entre la inmunidad innata y la adquirida.

Los PAMP son característicos de cada microorganismo, invariables y esenciales para su supervivencia y patogenicidad, pero no se encuentran en el huésped, lo que permite que el sistema inmune diferencie los antígenos propios de los extraños. Entre los principales PAMP cabe destacar el LPS, el ácido teicoico, la manosa o el RNA bicatenario y vírico⁷⁰. Dentro de los diferentes tipos de PRR, como los receptores de lectina de tipo C (CLR) o los receptores tipo NOD (NLR), los TLR son probablemente los PPR de mayor relevancia para el conocimiento del sistema inmune innato y, en particular, de la respuesta al consumo de alcohol⁶⁹. Deben su nombre, del inglés *toll-like receptor*, a que estructuralmente son similares a la proteína toll, receptor transmembrana perteneciente a la *Drosophila melanogaster*⁷¹.

Se han descubierto hasta el momento actual 13 TLR en mamíferos, de los cuales 10 están claramente descritos en humanos. Se localizan en la membrana plasmática y/o en la membrana endolisosomal de distintas células, activándose por diferentes agentes infecciosos⁶⁹ (tabla 1). El TLR4 fue el primero que se identificó en mamíferos y es el que mejor se conoce. Reconoce al LPS, componente de la superficie externa de las bacterias Gram-negativas⁷².

Tabla 1. Características de los principales TLR en humanos

Tipo de receptor	Localización	Principales ligandos
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteínas bacterianas
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteínas y peptidoglicanos bacterianos
TLR3	Membrana endolisosomal	RNA viral
TLR4	Membrana plasmática y membrana endolisosomal	Lipopolisacáridos
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteínas bacterianas
TLR7	Membrana endolisosomal	RNA viral
TLR8	Membrana endolisosomal	RNA viral
TLR9	Membrana endolisosomal	DNA bacteriano
TLR10	Membrana plasmática	Desconocido

Los TLR son receptores formados por un dominio N-amino terminal extracelular, que es el que reconoce el agente infeccioso, una sola región transmembrana y un dominio intracelular, llamado TIR (toll-interleukin-1-receptor), encargado de la activación en cascada de la señal inflamatoria⁶⁹. Cada TLR tiene su propio dominio extracelular específico para cada patógeno, mientras el dominio TIR es similar en todos. Los TLR utilizan posteriormente para las vías de señalización diferentes moléculas adaptadoras⁷³. Entre ellas, MyD88 y TRIF intervienen principalmente en la producción de citocinas inflamatorias^{69,74}, describiéndose así una vía de señalización dependiente de MyD88, utilizada por todos los TLR salvo TLR3, y dependiente de TRIF, utilizada por TLR3 y TLR4^{69,72}.

Señalización TLR dependiente de MyD88: tras la unión del patógeno con el dominio extracelular del receptor, el dominio TIR del receptor se une a MyD88⁷⁰,

siendo potenciada esta unión en los TLR2, 4 y 9 por la proteína MAL⁶⁹. La parte distal de MyD88 contiene un dominio llamado “dominio de muerte” (*death domain*)⁷⁴ que se fija a la familia de proteínas quinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK)^{69,72}, concretamente IRAK2 e IRAK4. Esta cascada de señalización llega hasta la formación del dímero IKK, el cual fosforila y degrada la proteína de inhibición IκB⁶⁹. Esto determina la entrada del NF-κB al núcleo, produciéndose la transcripción de genes productores de citocinas inflamatorias como TNF-α, IL-1 o IL-6^{69,70,72,75}.

Señalización TLR dependiente de TRIF: aunque esta molécula adaptadora es utilizada tanto por el TLR3 como el TLR4, las vías de señalización presentan pequeñas diferencias. El dominio TIR del TLR3 tras unirse al TRIF, provoca indistintamente la activación de la proteína TRAF6 o TRAF3. A través del TRAF3, se produce una cascada de fenómenos que se traducen en la producción nuclear de citocinas tipo interferón⁶⁹. El TLR4, además del TRIF, también requiere para la activación de esta vía otra molécula adaptadora, la TRAM. Su unión provoca la translocación del receptor al compartimento endosomal⁶⁹, que a su vez se une al TRAF6 y activa la cascada de señalización hasta producirse citocinas inflamatorias dependientes del factor NF-κB^{69,70,73}.

Aunque cada receptor reconoce un tipo de ligando específico, un mismo patógeno es capaz de expresar en su superficie diferentes ligandos que estimulen simultáneamente varios TLR y active el sistema inmune para permitir su eliminación. Así por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* es reconocido por TLR2, TLR4 y TLR9 y gérmenes como *Salmonella typhimurium* por TLR2 y TLR9⁶⁹.

Todos estos datos avalan la importancia del conocimiento de la activación y señalización de los TLR, que permite aclarar aspectos hasta ahora poco conocidos en el funcionamiento del sistema inmune innato y su conexión con la inmunidad adaptativa.

El alcohol y la señalización mediada por TLR

Los estudios hasta ahora realizados para describir el efecto modulador del alcohol sobre el sistema inmune han mostrado, como uno de los hallazgos más relevantes, el papel clave de los TLR^{54,68}, y de entre los 10 descritos en humanos, especialmente el TLR4^{76,77}. La enfermedad hepática alcohólica sirve como paradigma de este efecto pro-inflamatorio desarrollado por la exposición crónica al alcohol y su relación con los TLR. Estudios tanto en líneas celulares⁷⁸ como en modelos animales⁷⁹ y en humanos⁸⁰, demuestran el papel fundamental del TLR4 en el desarrollo de esta enfermedad. En primer lugar, el alcohol es capaz de incrementar los niveles de LPS en sangre^{80,81}, que a su vez es capaz de activar el receptor TLR4 de las células de Kupffer, macrófago residente hepático. Ello determina la producción por estas células de Kupffer de citocinas pro-inflamatorias por la vía del NF- κ B⁵⁴ (como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8)⁶³ causantes del daño en el hígado y del círculo vicioso de inflamación y muerte celular que caracteriza la hepatopatía alcohólica. Otros autores han descrito a través de estudios realizados en pacientes, que la alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal no sólo incrementa en sangre el LPS, sino también otras sustancias, como ADN bacteriano⁸², detectado por el TLR9 y que por tanto podría intervenir también en la producción de citocinas pro-inflamatorias^{83,84}. Además del TLR4 y del TLR9, se observó en modelos animales con enfermedad alcohólica hepática, un incremento en la expresión del TLR1, 2, 4, 6 y 7⁸⁴ en tejido hepático y, como consecuencia, un aumento en la producción del TNF- α .

Los TLR también juegan un papel importante en el desarrollo de la neuroinflamación y neurodegeneración como consecuencia del alcoholismo crónico⁸⁵. El papel esencial que desempeña aquí el TLR4 fue demostrado inicialmente en un estudio en el que ratones *knockout* para el receptor TLR4 comparados con ratones

normales, que tras ingesta crónica de alcohol, no presentaban niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias y como consecuencia, tampoco daño cerebral⁷⁷. Similares trabajos reflejan, también en modelos animales, la activación de células gliales a través principalmente de los TLR4, aunque también a través del TLR2⁸⁶ y TLR3^{87,88}, provocando incrementos en los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . En alguno de estos estudios, se ha podido observar pequeñas diferencias relacionadas con el sexo, siendo los ratones hembras más sensibles a la capacidad neurotóxica del alcohol mediada por el TLR4⁸⁹.

La implicación de la vía de los TLR también ha sido descrita en el consumo intensivo de alcohol. Estudios recientes han demostrado como a nivel hepático también se produce daño mediado fundamentalmente a través del TLR4⁷⁶. En relación con la neuroinflamación inducida por el *binge drinking*⁹⁰, la activación inflamatoria parece estar determinada por el estímulo del TLR2^{86,91}, TLR3⁹⁰ y TLR4^{86,90-93} en la corteza prefrontal, produciendo neuroinflamación y desmielinización durante la adolescencia, periodo fundamental en la maduración cerebral. El resultado es una reducción en la neurogénesis y extensión axonal, lo que provoca alteraciones en el aprendizaje del adulto, así como en funciones cognitivas y emotivas^{90,92}.

El efecto negativo del consumo agudo de alcohol sobre el hígado, así como la neuroinflamación inducida tras el *binge drinking*, es concordante con la elevación descrita de los niveles séricos de LPS por aumento de la permeabilidad intestinal, en un modelo experimental de consumo agudo de alcohol en humanos^{64,76}. Sin embargo, aunque esto nos haría pensar en la existencia de un efecto pro-inflamatorio al estimular el LPS el TLR4, otros estudios *in vitro* han demostrado que los niveles de citocinas pro-inflamatorias están disminuidos tras la exposición aguda a etanol o el consumo agudo de esta sustancia^{63,75}, debido precisamente a la alteración en la señal mediada por

TLR4^{72,75,94}, pero también por TLR3⁹⁵ y TLR8⁹⁴. Son varios los mecanismos por los que se ha descrito que se produce dicha alteración, como la inhibición de la fosforilación de IKK α e IKK β , pertenecientes a la cascada inflamatoria del TLR4 y de los receptores con respuesta MyD88 dependientes, en un modelo *in vitro* de exposición de monocitos a etanol^{72,76}. Otra de las hipótesis que se ha estudiado, es la actuación del etanol sobre las *lipid rafts*, estructuras de la membrana plasmática ricas en colesterol de los macrófagos, en donde se encuentran ubicados diferentes TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9) y que sirven a su vez de plataforma para su activación⁷³. La exposición aguda a alcohol en un modelo de varias líneas celulares *in vitro*, interfirió en el reclutamiento de los TLR a las *lipid rafts*, sobre todo del TLR4^{76,96}, y alteró su estructura y su adhesión a la molécula facilitadora CD4⁶³, dificultando así la activación del receptor^{73,96}. Todo ello provocó una disminución de la producción por monocitos y macrófagos, de las citocinas NF- κ B dependientes^{53,63,80}.

Los modelos experimentales de consumo de alcohol en humanos también presentan resultados contradictorios. Como hemos mencionado, se ha comprobado el incremento de LPS tras la ingesta aguda de alcohol, así como de la proteína ligadora de LPS (LBP) y de la forma soluble del receptor CD14 (sCD14), ambos considerados reactantes de fase aguda tras el incremento de LPS^{64,97}. En otro estudio reciente, también en voluntarios sanos que consumieron dosis elevadas de alcohol hasta alcanzar los niveles definidos para el *binge drinking*, a los 20 minutos de la ingesta de alcohol se observó un estado pro-inflamatorio caracterizado por un incremento en sangre periférica de leucocitos, monocitos y células *natural killer* así como de citocinas pro-inflamatorias⁵⁹. Sin embargo, a las 2-5 horas post-ingestión los resultados sugirieron una respuesta inmunesupresora, con reducción en el reclutamiento de monocitos y leucocitos circulantes, descenso de citocinas pro-inflamatorias y niveles elevados de

IL-10⁵⁹. Estos datos sugieren un efecto bifásico del *binge drinking* sobre el sistema inmune: tempranamente un estado pro-inflamatorio seguido de una respuesta anti-inflamatoria que se prolonga en el tiempo.

Por tanto, aunque está comprobada la participación de los receptores TLR en la fisiopatología de las alteraciones en respuesta inmune tras el consumo agudo de alcohol o *binge drinking*, los mecanismos concretos así como el efecto final, no están del todo aclarados. La disparidad entre los resultados descritos y la controversia existente, puede explicarse por los diferentes modelos empleados para el estudio de las alteraciones inducidas por el consumo agudo de alcohol. No sólo existen potenciales diferencias entre modelos animales y modelos *in vitro* o *in vivo*⁹⁸, sino que son escasas las investigaciones realizadas directamente en personas con consumo intensivo de alcohol^{59,64,97}. Además, estos estudios en humanos se han realizado en un contexto de ingesta de alcohol controlada, dado que por motivos éticos, no es posible inducir un estado de intoxicación etílica grave. El análisis de pacientes con intoxicación alcohólica aguda resultaría por tanto, de gran relevancia para aportar nuevas evidencias en este campo y asegurar una mayor orientación y aplicación clínica de los resultados.

OBJETIVOS

A partir de los datos expuestos anteriormente en los que se aprecia que el consumo agudo de alcohol influye sobre la respuesta inmune, nos planteamos como hipótesis que aquellos pacientes con intoxicación etílica aguda tras un CIA o *binge drinking* presentan una activación de la respuesta inmune innata en sangre periférica frente a los sujetos sanos. Como consecuencia, estos pacientes presentarán un incremento de los niveles plasmáticos del ARNm de TLR y citocinas pro-inflamatorias,

Por todo ello nuestro **objetivo general** será:

- Determinar la activación de la respuesta inmune innata en sangre periférica de pacientes con CIA o *binge drinking* en comparación con sujetos sanos.

Y, como **objetivos específicos**:

- Determinar la expresión de ARNm en sangre periférica de TLR1, TLR2, TLR4, y citocinas pro-inflamatorias (TNF-alfa, IL-1 β e IL-8) en pacientes con CIA o *binge drinking* en comparación con sujetos sanos.
- Detectar en plasma los niveles de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas.
- Analizar diferencias de dichos parámetros en función del género.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El presente estudio se ha realizado con un diseño de casos y controles en el que se han comparado dos grupos diferentes de sujetos:

- *Casos*: sujetos con intoxicación etílica aguda secundaria a un episodio de CIA o *binge drinking* que fueron atendidos en el Servicio de Urgencias del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).
- *Controles*: voluntarios sanos con distribución de edad y sexo similares a los casos.

Muestra objeto de estudio

Casos

El grupo de casos se formó con un total de 25 individuos, de los cuales 13 fueron varones y 12 mujeres. La edad media fue 20,10 años (desviación estándar: 4,27).

Los criterios de inclusión establecidos fueron:

- Edad comprendida entre los 14 y 35 años.
- Clínica de intoxicación alcohólica aguda con alcoholemia superior a 0,8 g/L.

Los criterios de exclusión establecidos fueron:

- Ausencia de consumo de otras drogas de abuso (p. ej. cannabis, cocaína...), determinado mediante sospecha clínica y/o análisis toxicológico de orina.
- Sospecha de consumo crónico o dependencia del alcohol.

- Enfermedad aguda intercurrente que pueda alterar la respuesta inflamatoria, como infecciones o accidentes de tráfico.
- Antecedentes de enfermedades crónicas (procesos autoinmunes, procesos tumorales) o toma de medicación que pudiera afectar los resultados del estudio (medicamentos inmunomoduladores, antiinflamatorios, etc.)
- Alteraciones en la analítica no explicadas (p. ej., anemia o elevación de transaminasas en el suero).

Controles

El grupo de control se compuso de 23 voluntarios, de los cuales 7 fueron varones y 16 mujeres, cuya edad media fue de 23,37 años (desviación estándar: 2,92). La mayoría de ellos fueron seleccionados entre los estudiantes de Medicina y Enfermería de la Universidad de Salamanca.

Los criterios de inclusión que se establecieron fueron:

- Edad comprendida entre los 18 y 35 años con consumo de alcohol igual o menor a 10 gramos al día de forma habitual.
- Que no hubieran ingerido alcohol en las 72 horas previas y que no hayan tenido episodios de CIA o *binge drinking* en los 3 últimos meses, o que los realicen habitualmente.

Asimismo, se fijaron los criterios de exclusión ya definidos previamente para los casos.

En todos los sujetos de la muestra, se recogió información en base a un cuestionario estandarizado (tabla 2) sobre la cantidad de alcohol que había ingerido en el momento de la inclusión en el estudio, si realizaba habitualmente este tipo de

consumo y si así era, con qué frecuencia, y si asociaba habitualmente el uso de otro tipo de drogas de abuso.

Tabla 2: Preguntas realizadas tanto a casos como a controles

CUESTIONARIO
¿Has bebido alcohol en los tres últimos días? ¿Qué cantidad?
¿Qué cantidad de alcohol bebes habitualmente?
El alcohol que bebes, ¿lo haces diariamente o esporádicamente los fines de semana (botellón)?
¿Cuántas borracheras te coges al mes?
¿Consumes otro tipo de drogas? ¿Cuáles? ¿Con qué frecuencia?

Para los casos, la extracción de sangre se realizó durante su atención en el Servicio de Urgencias siguiendo el protocolo habitual en la atención de un paciente con bajo nivel de conciencia secundario a intoxicación. Una vez que dicho paciente recuperaba el nivel de conciencia, se comprobaba que reunía los criterios establecidos para su inclusión en el estudio y que era capaz de entender y aceptar su participación, se le solicitaba el consentimiento informado por escrito para poder incluirlo en el estudio y utilizar parte de la muestra sanguínea que se le había extraído con fines de investigación. En caso de que fuera menor, debía ser autorizado por el padre/madre o tutor legal. En el caso de los controles, la información y el consentimiento se obtuvieron antes de la extracción de las muestras sanguíneas.

En ambos grupos, las muestras fueron obtenidas siguiendo las regulaciones legales para estudios clínicos en España y las del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Salamanca, del que se obtuvo la aprobación para el protocolo del estudio el 20 de noviembre de 2012.

Extracción y procesamiento de muestras

Mediante venopunción de sangre periférica, se extrajeron tres tubos:

- Tubo con anticoagulante EDTA que se utilizó para la determinación del hemograma y fórmula leucocitaria según los parámetros propios del Servicio de análisis clínicos del CAUSA.
- Tubo con heparina, que se centrifugó para obtener plasma y posterior determinación en el Servicio de Bioquímica del CAUSA de los valores séricos de glucosa, creatinina, ionograma, perfil hepático y etanol. El remanente se almacenó a -80 °C para posteriores análisis.
- Tubo PAXgene™ Blood RNA, que permite la estabilización del RNA de sangre total, extraído en el mismo momento que el resto de los tubos y almacenado a -80°C para su posterior procesamiento.

Cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*) a tiempo real o PCR cuantitativa, es una variación de la PCR estándar que se usa para la cuantificación en una muestra determinada de la cantidad de ADN o ARNm perteneciente a un gen específico. Permite detectar y evaluar la amplificación de dicho gen en cada uno de sus ciclos, para lo cual, se precisa un termociclador y un fluorímetro que detecta la fluorescencia emitida por sondas unidas al ADN replicado o amplicón. Este proceso se divide en 4 fases (figura 6):

- Fase inicial: la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no supera la fluorescencia de fondo del medio circulante, permitiendo así calcular la línea base.
- Fase exponencial temprana: es el momento en el que la fluorescencia producida por el producto de PCR supera el umbral definido. A este punto se le denomina ciclo umbral o Ct (*cycle threshold*) e indica la cantidad de copias de ADN de la muestra que hay en la reacción. Cuanto más bajo es el valor de Ct, mayor es el número de copias de ADN de la muestra.
- Fase lineal: en esta fase la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo.
- Fase meseta o estacionaria: es el momento en que los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección, por lo que la reacción termina.

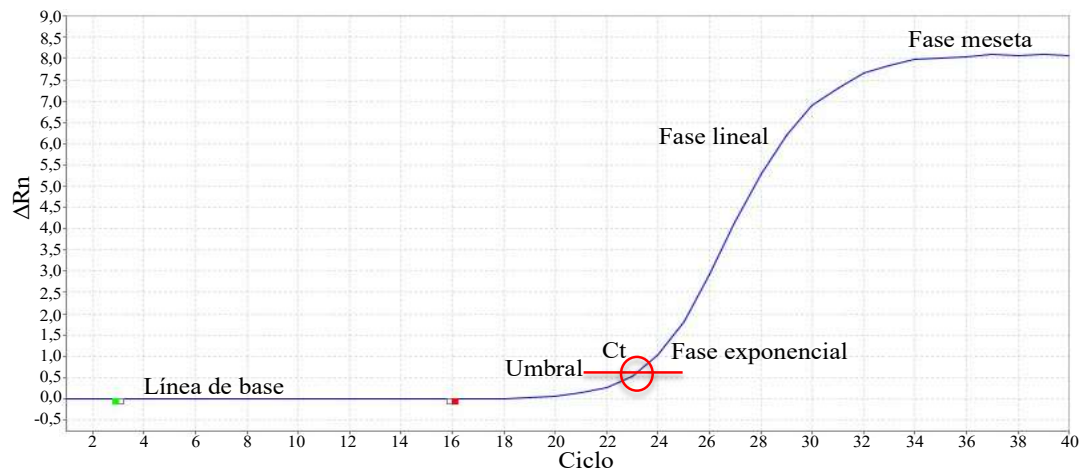


Figura 6. Modelo de curva de amplificación de PCR a tiempo real.

RT-PCR a partir de ARNm

El proceso de *reverse transcription*-PCR o RT-PCR a tiempo real es el método estándar para detectar los cambios relativos en la expresión génica del ARNm o ARN de pequeño tamaño (por ejemplo, micro-ARN) de un gen determinado presente en diferentes tejidos. En dicho proceso se sintetiza en primer lugar ADN complementario (ADNc) a partir del ARN de interés que se desea cuantificar. Posteriormente se realiza una PCR cuantitativa a tiempo real que amplifica dicho ADNc (figura 7). En este método la cantidad de ADNc se cuantifica de manera relativa, ya que se compara el número de copias del ADNc presentes frente a la expresión de un gen de referencia. Este gen de referencia se elige precisamente por tener una expresión uniforme en diferentes condiciones experimentales (gen control endógeno) y puede variar en función de estas, como se explicará posteriormente.

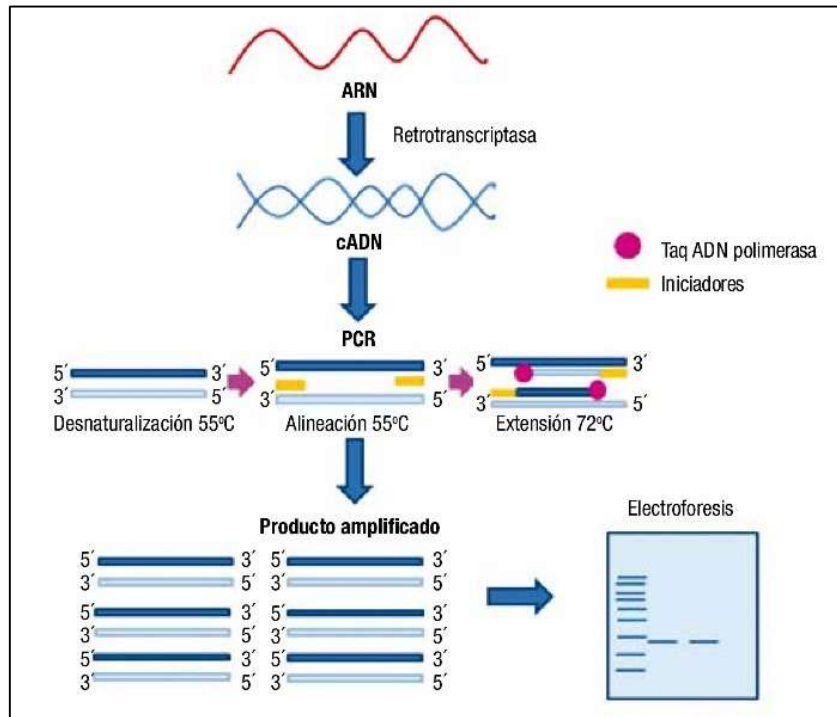


Figura 7: Esquema simple de RT-PCR; fuente: www.elsevier.es

Para la realización de dicha técnica, en nuestro proyecto el termociclador utilizado ha sido el equipo de PCR a tiempo real *Step-One-Plus* de Applied Biosystems. Hemos empleado la detección de la fluorescencia emitida por el fluorocromo SYBR Green I, que se une al ADN de doble cadena, la cual es 1000 veces mayor que si está libre en solución. Durante el proceso de la PCR, la DNA polimerasa amplifica el gen diana, y el fluorocromo se une a cada nueva copia o amplicón. De esta forma, la fluorescencia emitida en la muestra, irá aumentando proporcionalmente a la cantidad de amplicón resultante del proceso de la PCR⁹⁹ (Figura 8).

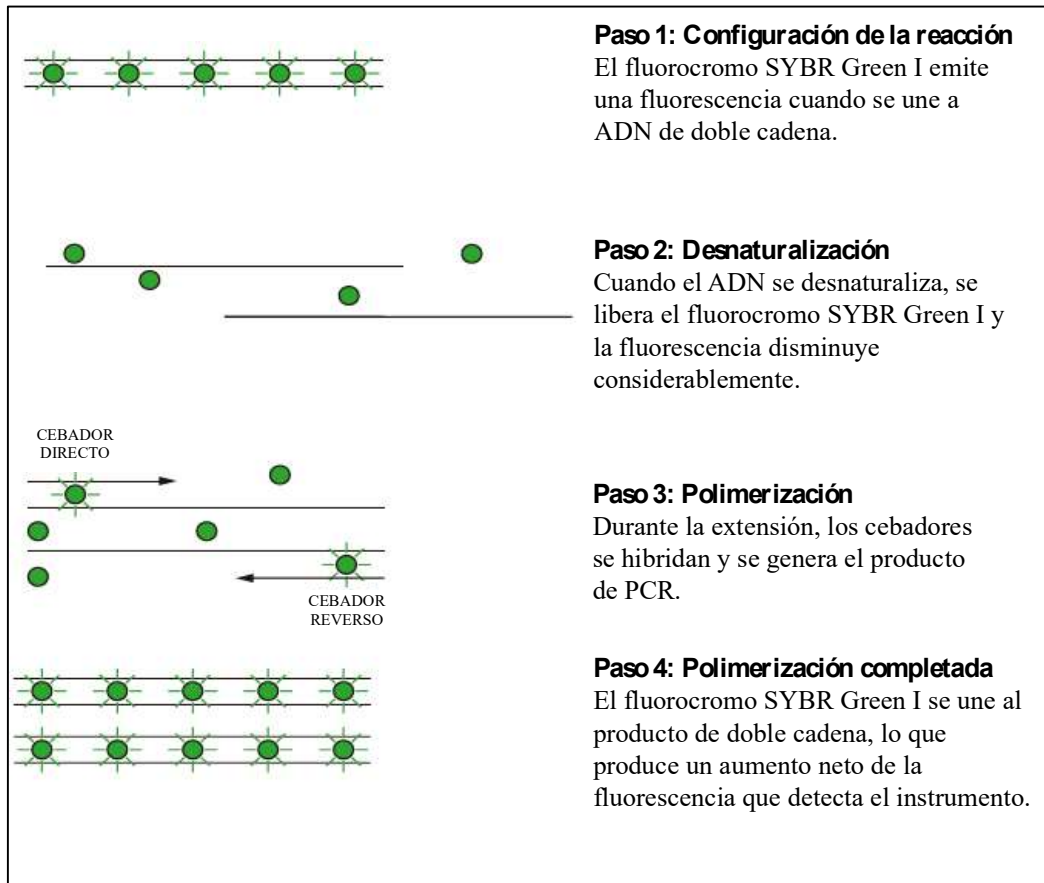


Figura 8: Funcionamiento de los reactivos SYBR Green. Modificado de la guía de reactivos de Applied Biosystems⁹⁹

Durante los ciclos de amplificación, pueden producirse fenómenos que falsifiquen el recuento final de la muestra. Los más comunes son los denominados dímeros de primer que se definen como un subproducto de la polimerización en cadena resultante de la hibridación de los extremos 3' de dos cebadores. Como consecuencia, la DNA-polimerasa se une y extiende los cebadores según la secuencia complementaria obteniéndose una doble hebra de menor tamaño que los genes habitualmente estudiados, pero a los cuales también se les unirá el fluorocromo SYBER Green I.

La RT-PCR a tiempo real permite detectar estos dímeros de primer, porque al final del proceso se obtiene las llamadas curvas de fusión o *melt curve*. Estas curvas representan el cambio de la fluorescencia emitida cuando la doble cadena del ADN pasa

a ser sólo una, al aumentar la temperatura de la reacción. En este momento, la fluorescencia desciende ya que también se libera el fluorocromo que estaba unido a la doble cadena. Este repentino cambio de fluorescencia se detecta cuando se alcanza la temperatura de fusión, T_m (del inglés *melt temperature*) y que se define como la temperatura a la que la mitad de una molécula concreta de ADN de doble cadena se desnaturaliza en dos cadenas simples. La temperatura de fusión de una cadena de ADN depende de su longitud y de su composición. Los amplicones son cadenas largas por lo que en general necesitan temperaturas de fusión más altas que aquellas cadenas cuya longitud sea menor. De esta forma, si en la curva de fusión se observa una alteración en su morfología, esto indica que existe replicación de otro material genético diferente al que estamos buscando, como son los dímeros de *primer*¹⁰⁰ (figura 9).

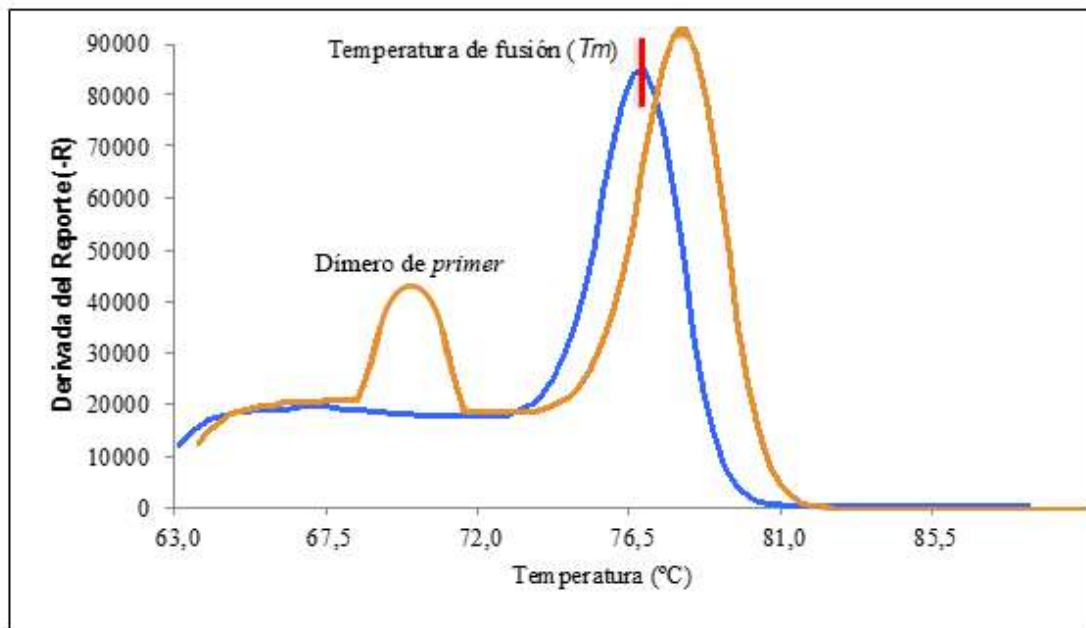


Figura 9: Imagen de curva de fusión o melt curve y dímeros de primer.

Selección de los genes de referencia

El gen de referencia ideal para la PCR o también denominado gen control, es el que se expresa de forma estable en todas las muestras analizadas, independientemente tanto de las condiciones experimentales de dichas muestras, como de la presencia o ausencia de enfermedad, del uso de fármacos o de las condiciones de cultivo, etc. Además, presenta unos niveles de expresión que son comparables a los del gen estudiado. Los genes que se han usado tradicionalmente como controles endógenos son, entre otros, los que codifican para las siguientes proteínas: ARN ribosomal 18s, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina, hipoxantina fosforribosil transferasa o beta-2-microglobulina. Sin embargo, aunque habitualmente estos genes se consideran como de referencia, su expresión puede variar con el tipo de tejido del que se ha extraído, del estado fisiológico del paciente o del control, y de las condiciones del diseño del estudio¹⁰¹. Por ese motivo, se han desarrollado diferentes algoritmos matemáticos que permiten analizar la idoneidad de los genes de referencia para cada experimento. Los más utilizados son el software GeNorm, NormFinder y BestKeeper¹⁰². El GeNorm es un programa que calcula el promedio de la variación por parejas de un gen en particular y se compara con la expresión de los demás genes de referencia¹⁰³. El NormFinder utiliza un algoritmo matemático que es capaz de evaluar las variaciones existentes dentro de los grupos experimentales¹⁰⁴. El algoritmo BestKeeper calcula la desviación estándar de la expresión de cada gen y el coeficiente de correlación de Pearson, de tal forma que el gen más estable es aquel con una desviación estándar más baja y un coeficiente de correlación más alto¹⁰⁵.

Para llevar a cabo el presente estudio se seleccionaron, y se validaron posteriormente como posibles genes de referencia, los genes de: actina, proteína ribosomal 36B4, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), peptidil-prolil-

isomerasa B isoforma X2 (PPIB X2), proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/5-triptófano (YWHAZ) y la subunidad A de la RNA polimerasa II (POLR2A). Para ello, se analizaron los niveles de expresión de su ARNm en muestras de sangre periférica de 10 casos y 10 controles, mediante PCR cuantitativa usando el equipo de PCR a tiempo real, mencionado previamente. La estabilidad de los genes de control candidatos, se determinó mediante los algoritmos estadísticos GeNorm y NormFinder, incorporados en el programa Genex y la plantilla Excel del algoritmo BestKeeper. Como se muestra en la figura 10, dicho análisis mostró que la expresión de los genes de actina, GAPDH y 36B4, fue la más estable en dichas muestras, y entre ellos el gen de la actina, que es el que se escogió para nuestro estudio.

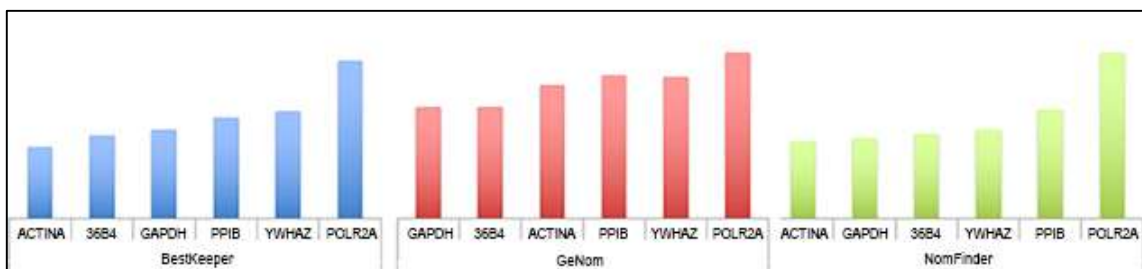


Figura 10: Resultados del análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos en sangre periférica.

Análisis de la expresión génica

La cuantificación relativa de la expresión de los ARNm fue calculada por un modelo matemático que determina los cambios en la expresión génica mediante la diferencia entre una muestra experimental, en nuestro caso, pacientes, y una muestra de referencia, en nuestro caso los controles. Este método incluye una corrección de la eficiencia de amplificación ya que presupone que la eficiencia de la amplificación del gen diana y del gen de referencia es similar. Por ello, cuando la eficiencia de

amplificación para ambos genes es cercana a 1, la cantidad del gen diana, normalizada a un control endógeno, se calcula según la siguiente fórmula¹⁰⁶:

$$\text{Cantidad relativa del gen diana} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Transcripción reversa y cuantificación de ARNm por PCR a tiempo real

Síntesis de ADNc a partir de ARNm

En nuestro estudio, la síntesis de ADNc a partir de ARNm mediante reacción de transcripción reversa se ha realizado a través del *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Según las indicaciones del fabricante se mezclaron 10 μL de ARN a una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, con 10 μL de la mezcla de reacción al 2X cuya composición se describe en la siguiente tabla 3:

Tabla 3: composición de la mezcla para la reacción de transcriptasa reversa

COMPONENTES	VOLUMEN DE LA REACCIÓN
10X RT Buffer	2,0 μL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 μL
10X RT Random Primers	2,0 μL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 μL
RNase Inhibitor	1,0 μL
Nuclease-free H ₂ O	3,2 μL
Total Reaction	10,0 μL

Fuente: Reagent Guide. Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus, Real-Time PCR Systems.

El ADNc obtenido se diluyó a 1/10 y se conservó en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización para la PCR.

Las condiciones para la síntesis del ADNc fueron: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 120 minutos, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.

Cebadores o primers

En nuestro estudio los genes estudiados fueron los del TLR1, TLR2, TLR4, TNF- α , IL-1 β e IL-8. El gen de referencia fue la actina, y las secuencias de todos los genes utilizadas se especifican en la tabla 4.

Tabla 4: secuencia de los primers empleados en este trabajo

Primers	Forward	Reverse
Actina	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
TLR1	CCACAACAAGTTGGTGAAGATTCT	GCATATAGGCAGGGCATCAAATG
TLR2	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG	AGGCGGACATCCTGAACCT
TLR4	CGAGGAAGAGAAGACACCAGT	CATCATCCTCACTGCTTCTGT
TNF-α	CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC	AGCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC
IL-1β	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
IL-8	TGGCTCTCTTGGCAGCCTTC	TCTCCACAACCCTCTGCACC

Para cada uno de los primers se calculó la temperatura de anillamiento, y se detectó que la óptima para todos ellos fue de 60 °C.

Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real

Para realizar la amplificación del ADNc, cada muestra se hizo por duplicado para reducir así la variabilidad en la concentración de las muestras. El volumen final de la amplificación fue de 10 μ L con los siguientes componentes (Tabla 5).

Tabla 5: Composición de la mezcla de la reacción de PCR

COMPONENTES	VOLUMEN
Mastermix SYBR Green	6 μ L
Cebadores o primers	0,6 μ L
H ₂ O	2,4 μ L
cDNA	1,0 μ L

Las condiciones de PCR a tiempo real utilizadas para amplificar cada uno de los oligonucleótidos fueron las siguientes (figura 11):

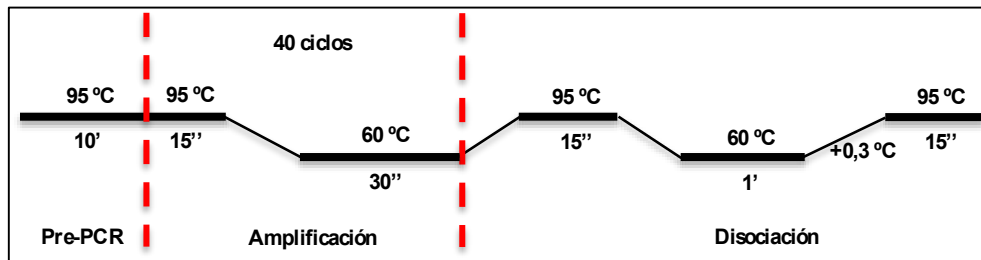


Figura 11: condiciones de la reacción de PCR a tiempo real

Cuantificación de las citocinas plasmáticas

La determinación de las citocinas en plasma se realizó a partir del plasma obtenido por centrifugación de los tubos de heparina extraídos, cuyo remanente se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta realizar la determinación. Estas muestras fueron analizadas utilizando un kit de microesferas magnéticas Milliplex MAP kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Se analizaron las siguientes citocinas y quimiocinas: factor estimulante de colonias (CSF), interferón (IFN)- γ , IL-10, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , fractalquina, factor estimulante de colonias (CSF), proteína quimioatrayante de monocitos-1 (MCP-1) y proteínas inflamatorias de macrófagos-1- α (MIP-1 α). Los datos se capturaron con un sistema Luminex 100 y analizados con el software MasterPlex CT versión 1.2.0.7 (Hitachi MiraiBio, USA). Esta parte del trabajo se realizó en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia en colaboración con el grupo de la Dra. Consuelo Guerri.

Métodos estadísticos

En el presente estudio, y como ya se mencionó previamente, para el cálculo de los genes de referencia, se utilizaron los algoritmos estadísticos GeNorm y NormFinder, incorporados en el programa Genex versión 5.44 y la plantilla de Excel del algoritmo BestKeeper. El cálculo de la expresión cuantitativa relativa de los ARNm estudiados se realizó mediante una plantilla de Excel con las ecuaciones de RT-PCR cuantitativa relativa descritas. Para comprobar la ausencia de valores extremos se utilizó una plantilla de Excel con el test de Grubbs¹⁰⁷.

El análisis estadístico de la comparación de variables entre el grupo de casos y el grupo control, las diferencias en la expresión cuantitativa de los ARNm así como los análisis de correlación, se realizaron con el programa SPSS versión 20 para PC. Las variables cuantitativas se presentan como la media y su desviación estándar y fueron comparadas mediante la U de Mann-Whitney, al ser variables cuantitativas e independientes. El análisis de las correlaciones entre variables cuantitativas se realizó mediante la correlación con el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). El nivel de significación α se estableció en el 5%.

La comparación de resultados de las citocinas plasmáticas se determinó mediante una ANOVA de dos vías (incluyendo el género y la variable intoxicación alcohólica/control) con el programa GraphPad Prism v5.01.

Financiación

El estudio fue desarrollado en el contexto del proyecto “Análisis de la respuesta inflamatoria mediada por receptores tipo toll tras el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*”, con código GRS 1046/A/14, financiado por la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León en la Convocatoria de Proyectos de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud 2014.

RESULTADOS

Características de la muestra objeto de estudio

En nuestro trabajo, la muestra de estudio se compuso de un total de 47 individuos. De ellos, 24 fueron pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias incluidos dentro del grupo de casos al haber consumido alcohol; su edad media fue de 20,11 años. Los restantes 23 participantes, con una edad media de 23,38 años, se incluyeron en el grupo de controles al ofrecerse como voluntarios y cumplir los criterios de inclusión establecidos. Las variables clínicas y analíticas de estos grupos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: resultados analíticos de la muestra de estudio

VARIABLE	CASOS n = 24	CONTROLES n = 23	P
Edad	20,11 (4,27)	23,38 (2,92)	<0,001
Relación varón/mujer	13/12	7/16	0,218
Etanol (g/L)	2,37 (0,55)	0	
AST (U/L)	26,30 (13,44)	17,90 (3,82)	0,002
ALT (U/L)	19,81 (14,63)	18,00 (21,28)	0,4
FA (U/L)	76,92 (35,31)	60,81 (11,15)	0,062
GGT (U/L)	19,51 (15,20)	14,24 (6,22)	0,036
LDH (U/L)	226,97 (117,15)	162,67 (27,57)	<0,001
Leucocitos (x10³/μL)	9001,05 (2347,38)	7517,08 (3383,43)	0,003

Las variables cuantitativas se presentan como media (desviación estándar) y se compararon mediante la U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se compararon mediante una χ^2 o el test exacto de Fisher. (AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; LDH: lactato deshidrogenasa).

En relación a la encuesta de cinco preguntas, utilizada con el fin de conocer la cantidad de alcohol consumida y el patrón de consumo, los controles contestaron en su totalidad a las preguntas, pero no fue así con los casos, que rehusaron hacerlo en un elevado porcentaje (28,94%), obteniendo información sólo de 18 pacientes.

En los casos incluidos en nuestro estudio, las respuestas que obtuvimos a las preguntas fueron las siguientes:

-*¿Has consumido alcohol en los tres últimos días? ¿Qué cantidad?:* un total de 9 participantes respondieron positivamente, con un consumo medio de 4 copas o combinados.

-*¿Qué cantidad de alcohol bebes habitualmente?:* de los 18 que respondieron, 9 negaron el consumo habitual de alcohol, siendo ésta, una situación puntual. El resto de participantes, reconocieron beber una media de 2-3 copas por fin de semana.

-*El alcohol que bebes, ¿lo haces esporádicamente o los fines de semana (botellón)?:* el 100% de los encuestados admiten que el consumo de alcohol lo hacen los fines de semana en forma de botellón.

-*¿Cuántas borracheras te coges al mes?:* un total de 11 participantes negaron emborracharse. Pero lo que respondieron positivamente, reconocieron emborracharse con una proporción similar tanto lo que lo hacen semanalmente, como una vez al mes o 2-3 veces al mes.

-*¿Consumes otro tipo de drogas? ¿Cuáles? ¿Con qué frecuencia?:* sólo 3 de los encuestados reconocieron consumir otro tipo de drogas, concretamente cannabis, haciéndolo de forma puntual.

En el grupo de controles, la encuesta fue respondida en su totalidad, lo que es acorde con el hecho de que la respuesta negativa a la primera pregunta fuera necesario

como criterio de inclusión. Todos los controles negaron consumo de alcohol habitual, aunque en ocasiones tomaran alguna cerveza o copa muy esporádicamente. No referían episodios previos de intoxicación etílica. Ninguno refirió el consumo de otro tipo de drogas.

Expresión de ARNm de TLR en sangre periférica

Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR1

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del ARNm correspondiente al TLR1 en sangre periférica de los pacientes con CIA o *binge drinking* y de los controles, se muestran en la Figura 12. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,659$).

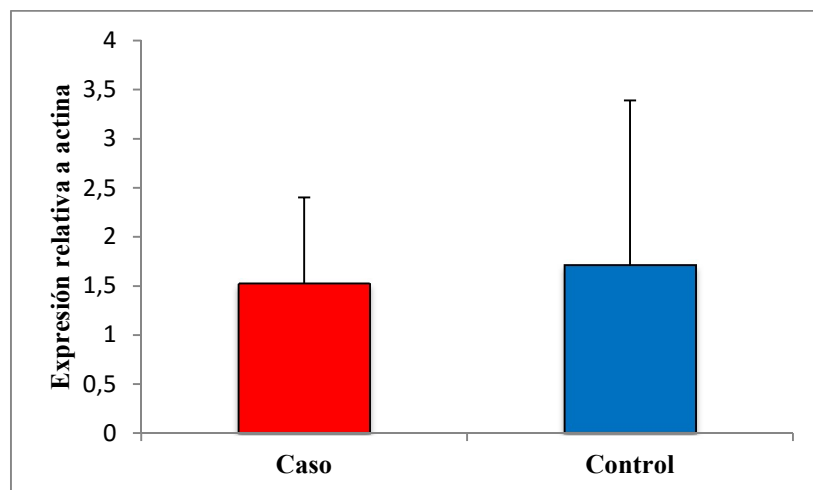


Figura 12: Expresión relativa del TLR1. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Al realizar el análisis por sexos, obtuvimos que las diferencias de expresión tanto en varones como en mujeres por separado, no son significativas, con un valor de P para mujeres de 0,825 y para varones de 0,659 (Figura 13)

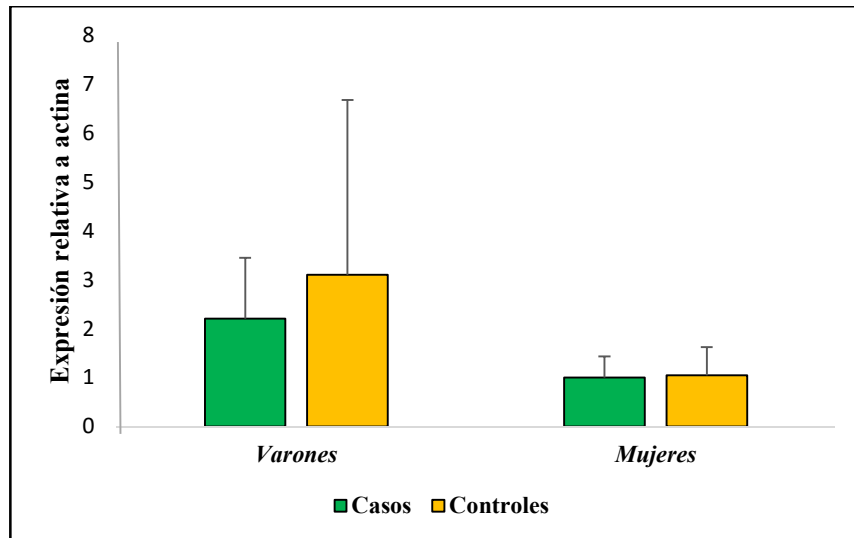


Figura 13: Expresión relativa del ARNm del TLR1 en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR2

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del ARNm correspondiente al TLR2 en sangre periférica de los pacientes con CIA o *binge drinking* y de los controles, se muestran en la Figura 14. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,892$).

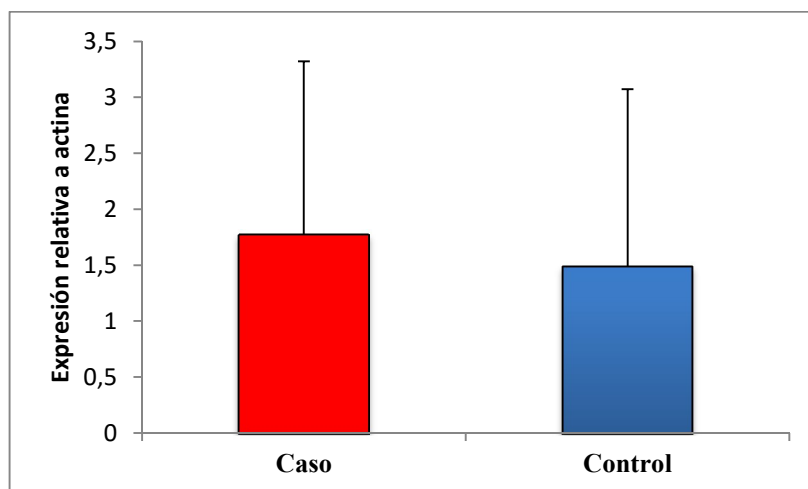


Figura 14: Expresión relativa del TLR2. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Realizada la estratificación por sexos, obtuvimos resultados que nos muestran que la expresión del gen del TLR2 no se encuentra incrementada significativamente en los casos frente a los controles, ya sea en mujeres ($P = 0,159$) o en varones ($P = 0,892$, figura 15).

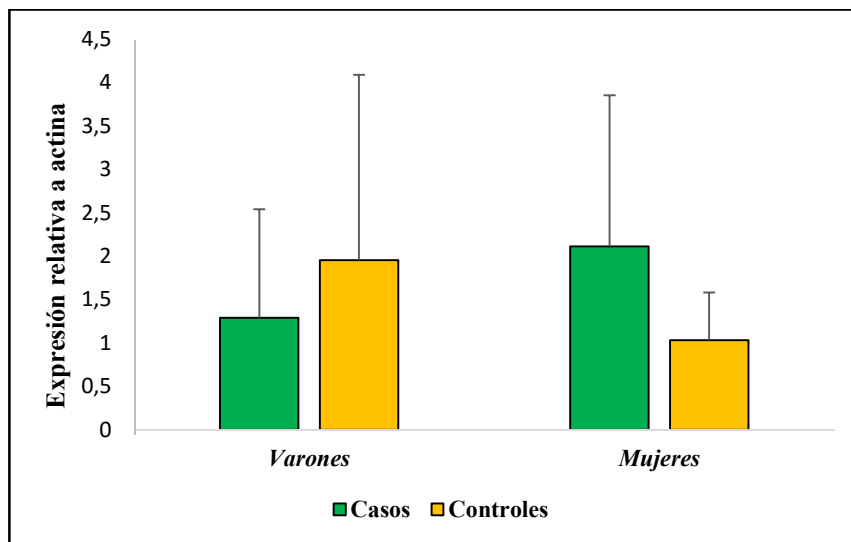


Figura 15: Expresión relativa del ARNm del TLR2 en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Expresión en sangre periférica del ARNm del TLR4

Tras analizar la expresión en sangre periférica del ARNm perteneciente al TLR4 en casos y en controles, los resultados demostraron que la expresión estaba incrementada en los casos respecto a los controles (Figura 16), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,002$).

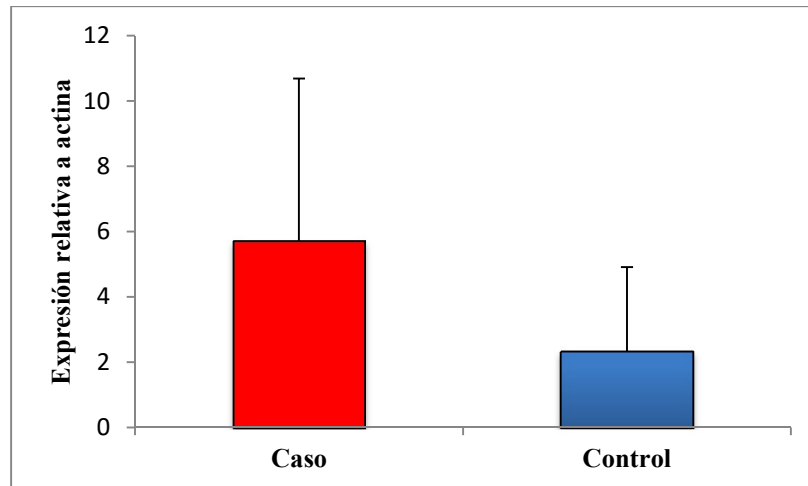


Figura 16: Expresión relativa del TLR4. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Al estratificar por sexos, se observó como en mujeres la diferencia de expresión del ARNm del TLR4 estaba incrementada en los casos frente a los controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,007$). Por el contrario, en varones, no se encontró una diferencia significativa ($P = 0,227$, Figura 17).

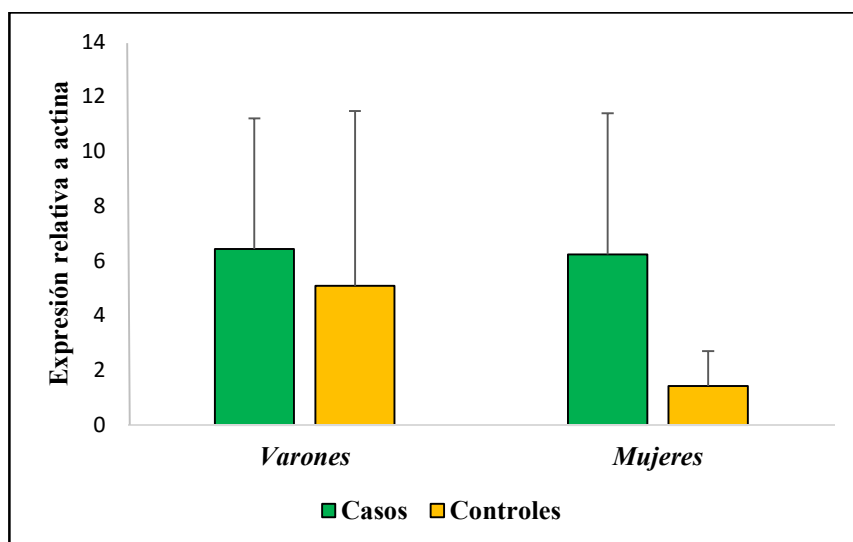


Figura 17: Expresión relativa del ARNm del TLR4 en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Dada la diferencia de edad entre los casos y los controles, se realizó también un subanálisis estratificando por edad. Tras dividir a la muestra en sujetos de <22 años (n = 16 para casos y 5 para controles) y ≥ 22 años (n = 13 para casos y 14 para controles), se mantuvo el incremento de TLR4 en casos aunque sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de edad ≥ 22 años (figura 18).

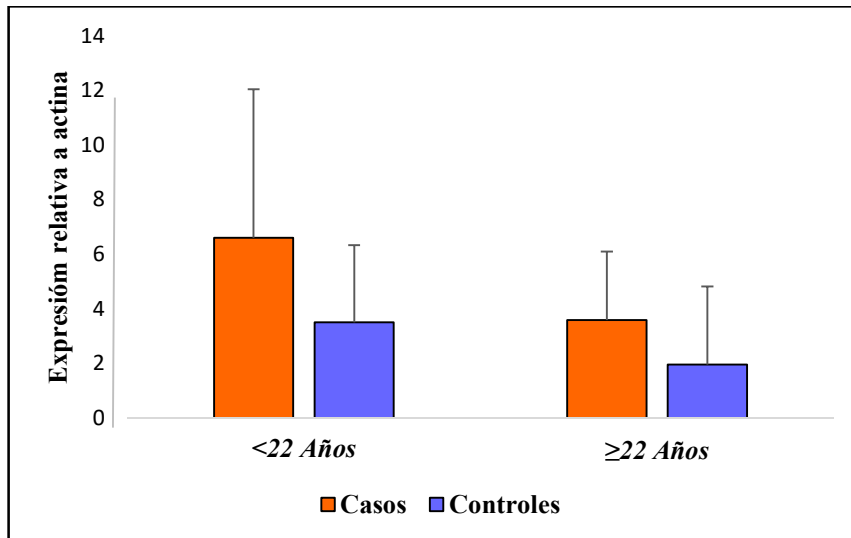


Figura 18: Expresión relativa del ARNm del TLR4 en sangre periférica estratificada por edades. En el grupo <22 años $P=0,290$; Para el grupo ≥ 22 años $P=0,045$.

Expresión de ARNm de citocinas pro-inflamatorias en sangre periférica

Expresión del ARNm de TNF- α en sangre periférica

Al realizar la comparación entre la expresión del ARNm correspondiente al TNF- α en sangre periférica de los pacientes con CIA o *binge drinking* y los controles, los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,318$, figura 19).

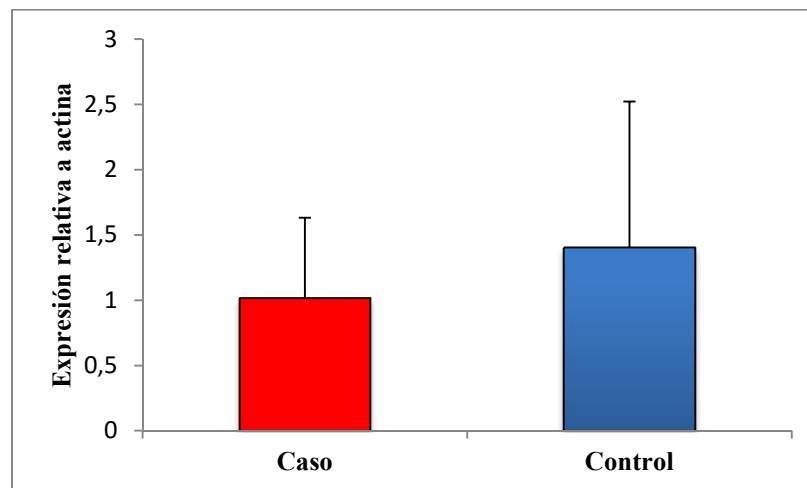


Figura 19: Expresión relativa del TNF- α . La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Al comparar la expresión del ARNm del TNF- α en sangre periférica por sexos, observamos que no existían tampoco diferencias estadísticamente significativas, obteniéndose unos valores para mujeres $P = 0,878$ y para varones $P = 0,964$. (Figura 20).

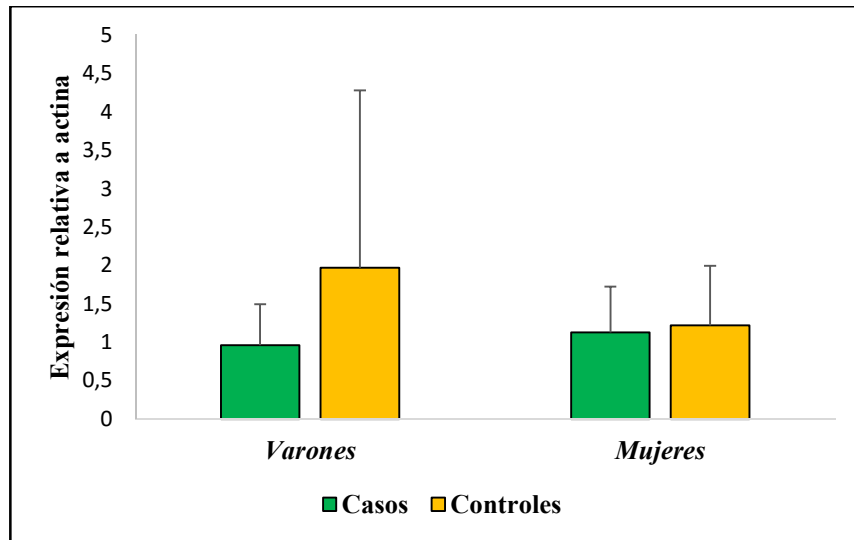


Figura 20: Expresión relativa del ARNm del TNF- α en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Expresión del ARNm de la IL-1 β en sangre periférica

Quando realizamos la comparación de la expresión del ARNm de la IL-1 β en sangre periférica entre los casos y los controles, no hallamos diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,765$). Los resultados de estos datos se muestran en la figura 21.

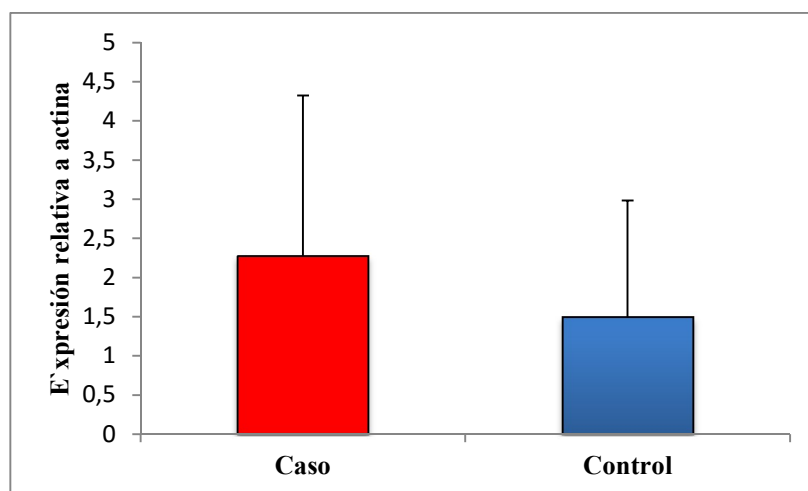


Figura 21: Expresión relativa del IL-1 β . La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Tras realizar la comparación entre sexos, observamos cómo la expresión del gen entre los casos y los controles mujeres es estadísticamente significativo ($P = 0,047$). Sin embargo en los varones no existe esta diferencia ($P = 0,765$, Figura 22).

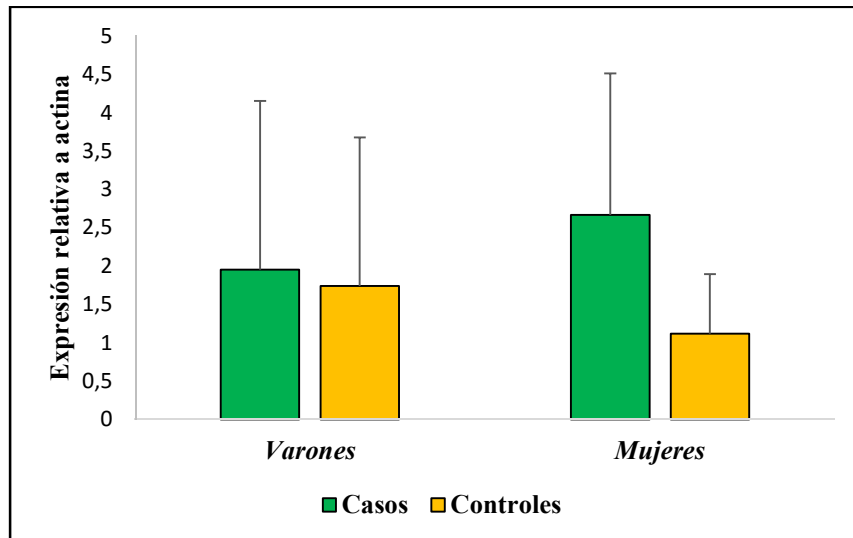


Figura 22: Expresión relativa del ARNm de la IL-1 β en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Expresión del ARNm de la IL-8 en sangre periférica

Al examinar las diferencias en la expresión del ARNm de la IL-8 entre los casos y los controles, observamos diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,012$). Además, al estratificar por sexos detectamos en las mujeres un incremento significativo de la expresión en los casos frente a los controles ($P = 0,032$). Sin embargo en los varones no se comprobó tal diferencia ($P = 0,103$). Ambos resultados se reflejan en la figura 23, en la que se incluyen para todas las muestras, y en la figura 24, con las muestras de varones y mujeres por separado.

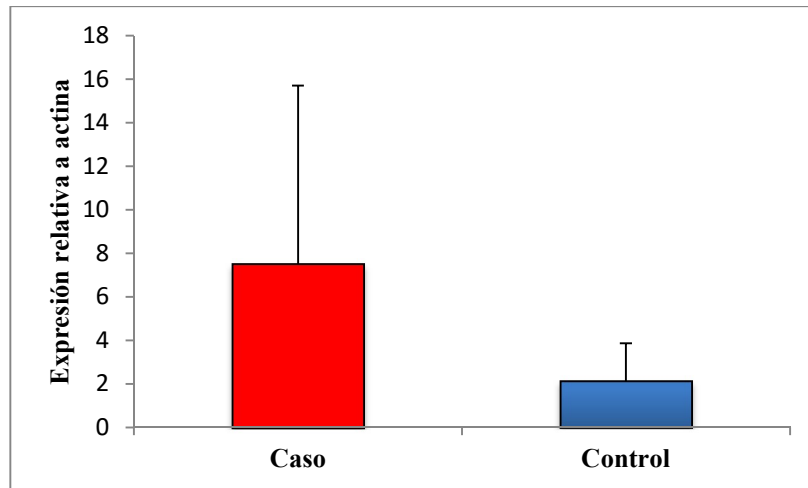


Figura 23: Expresión relativa de la IL-8. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

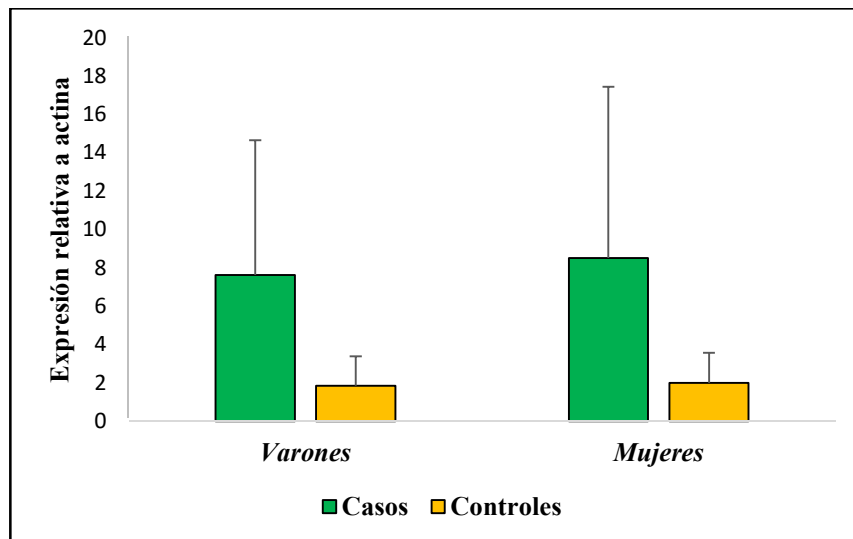


Figura 24: Expresión relativa del ARNm de la IL-8 en sangre periférica en varones y mujeres. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Al igual que se procesó en el estudio del TLR4, en el presente caso también estratificamos por edades la muestra, realizando la misma separación y estudio por subgrupos (<22 n =16 para casos y n =5 para controles; \geq 22, n =7 para casos y n =14 para controles). En este caso, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ambos grupos ($P =0,032$ y $P =0,45$, respectivamente) (figura 25).

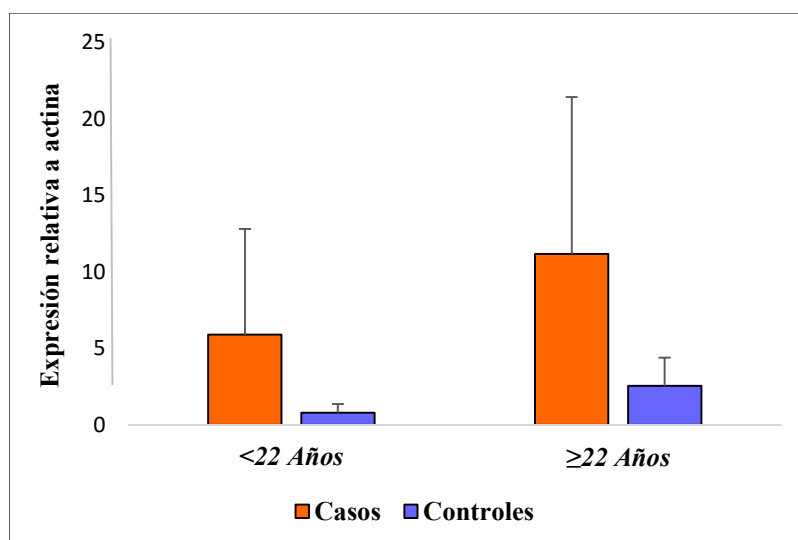


Figura 25: Expresión relativa del ARNm de la IL-8 en sangre periférica estratificada por edades. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa en la media del valor y la desviación estándar.

Niveles en plasma de citocinas y quimiocinas

Tras determinar los niveles de citocinas y quimiocinas en sangre periférica, y analizar si existían diferencias entre sexos, se detectaron los siguientes resultados: en las mujeres con intoxicación etílica los valores de INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, fractalquina, MIP-1 α y MCP-1 estaban incrementados significativamente con respecto a los niveles obtenidos en las mujeres del grupo control. El TNF- α , no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. En el grupo de los varones, sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles, en las siguientes citocinas: IL-4, IL-6, CSF y fractalquina (Figura 26).

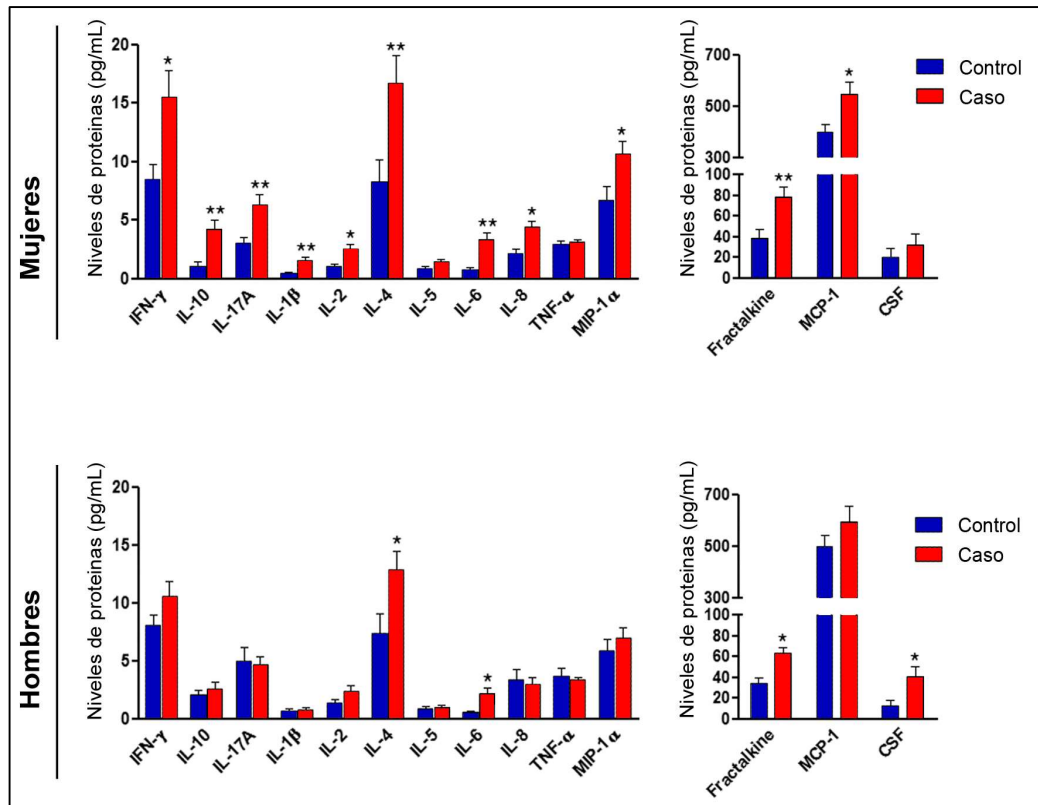


Figura 26: valores de citocinas y quimiocinas en plasma en casos y controles (varones y mujeres).

Correlación entre variables

Edad y expresión de ARNm del TLR4

El análisis de correlación entre la edad de los casos y controles, y los niveles de expresión del TLR4, mostraron una correlación negativa débil entre ambos valores, como se muestra en la figura 27, siendo dicha relación significativa (coeficiente de correlación Rho de Spearman $\rho = -0,407$, $P = 0,005$).

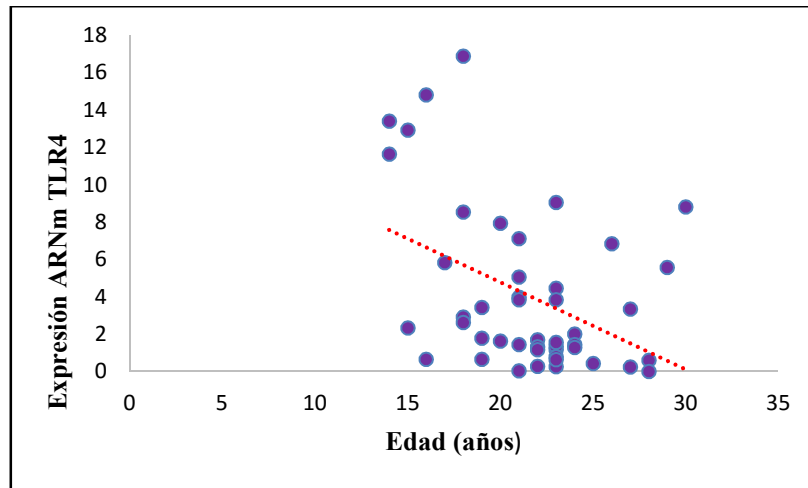


Figura 27: Correlación entre la edad de los casos y controles y la expresión del ARNm en sangre periférica del TLR4.

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR1

Tras examinar los niveles de etanol en sangre y la expresión del ARNm del TLR1 de los casos y controles, se observó una correlación era débilmente positiva, con un coeficiente Rho de Spearman de 0,109, sin significación estadística ($P= 0,519$, figura 28).

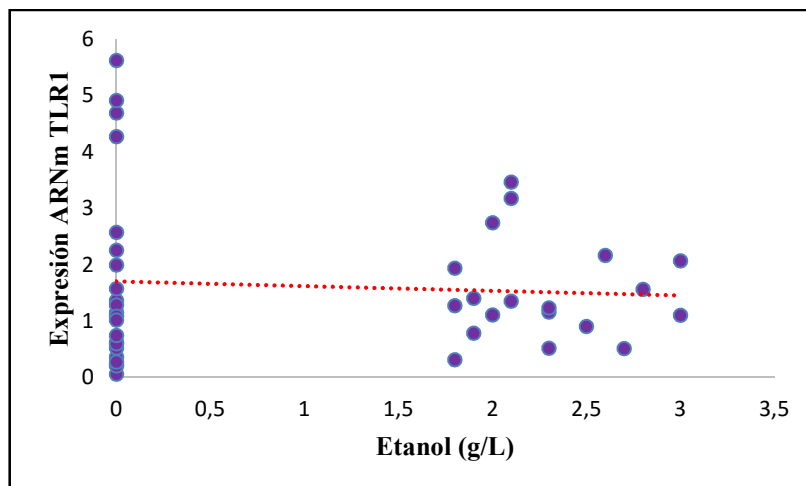


Figura 28: Correlación en sangre periférica entre el nivel de etanol de los casos y controles y la expresión del ARNm del TLR1.

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR2

Estudiamos la correlación entre los niveles de etanol en sangre y la expresión del ARNm de TLR2 en la muestra global, observándose prácticamente una ausencia de correlación ($\rho = 0,043$; $P = 0,786$). La representación de dicho análisis se muestra en la figura 29.

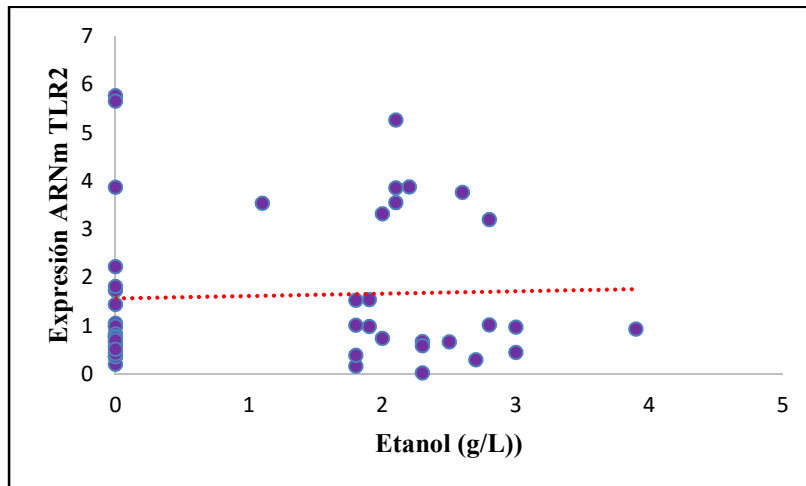


Figura 29: Correlación en sangre periférica entre el nivel de etanol de los casos y controles y la expresión del ARNm del TLR2.

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de TLR4

El análisis de correlación entre los niveles de etanol en sangre y la expresión del ARNm del TLR4 en ambos grupos de estudio, puso de manifiesto una relación positiva ($\rho = 0,451$), con significación estadística ($P=0,003$). Los resultados se muestran en la figura 30.

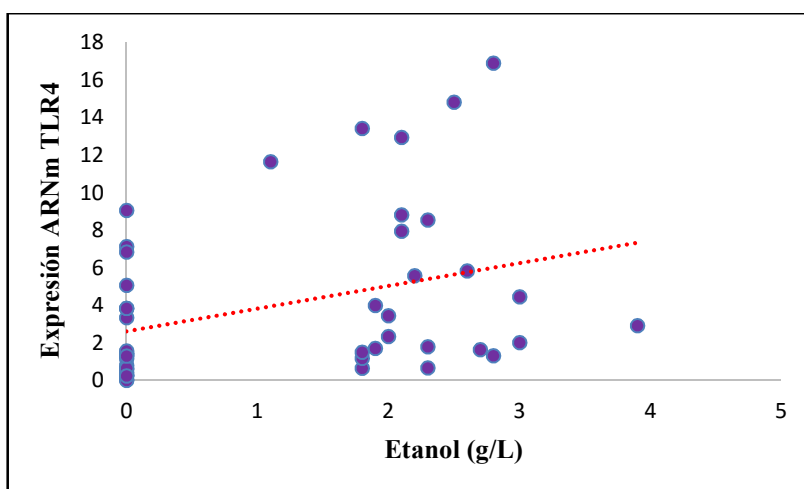


Figura 30: Correlación en sangre periférica entre los niveles de etanol de los casos y controles y la expresión del ARNm del TLR4.

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm del TNF- α

Tras examinar la correlación entre los niveles de etanol en sangre y la expresión del ARNm del TNF- α en los casos y en los controles, se observó una relación débilmente negativa pero estadísticamente no significativa. ($\rho = -0,146$; $P = 0,369$) (figura 31).

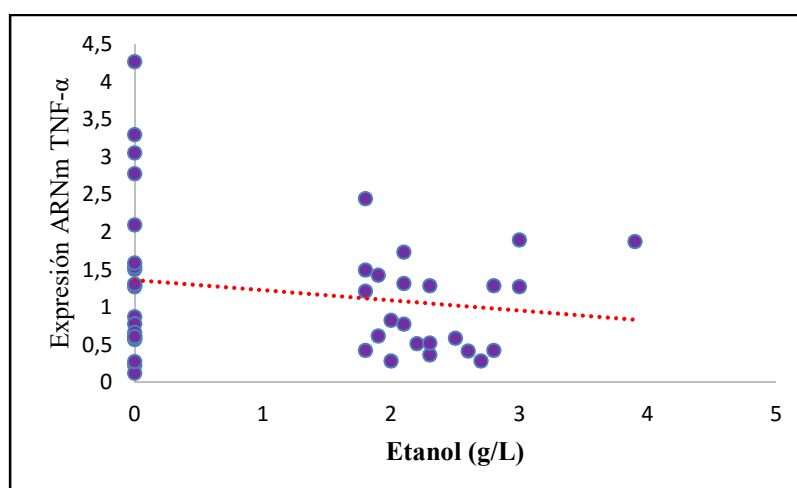


Figura 31: Correlación en sangre periférica entre los niveles de etanol en sangre de los casos y controles y la expresión del ARNm del TNF- α .

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de la IL-1 β

El análisis de la correlación entre los niveles de etanol en sangre y la expresión del ARNm de la IL-1 β tanto en los casos como en los controles, muestran que la relación es débilmente positiva sin significancia estadística ($\rho = -0,131$; $P = 0,415$). La distribución de los datos se muestra en la figura 32.

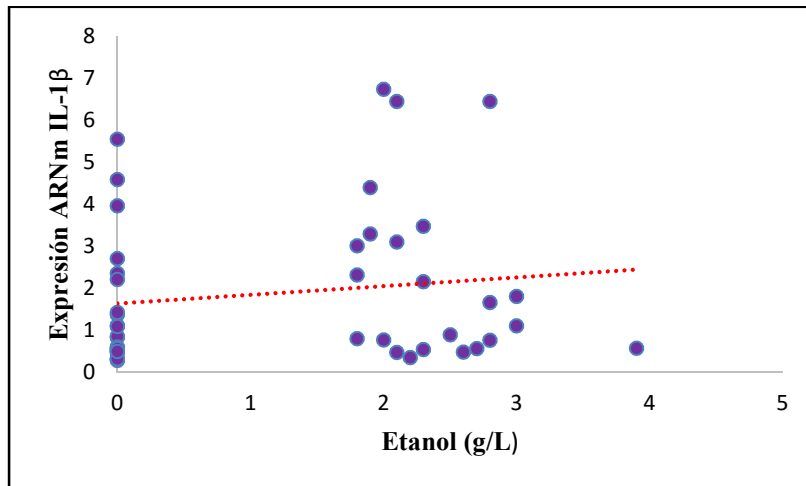


Figura 32: Correlación en sangre periférica entre los niveles de etanol de los casos y los controles y la expresión del ARNm de la IL-1 β .

Niveles de etanol en sangre y expresión de ARNm de la IL-8

Al establecer la correlación entre los niveles de etanol en sangre de los casos y controles con los valores de ARNm, se obtuvieron unos valores indicativos de la existencia de una correlación positiva ($\rho = 0,265$), aunque no estadísticamente significativa ($P = 0,104$). Dicha correlación puede observarse en la figura 33.

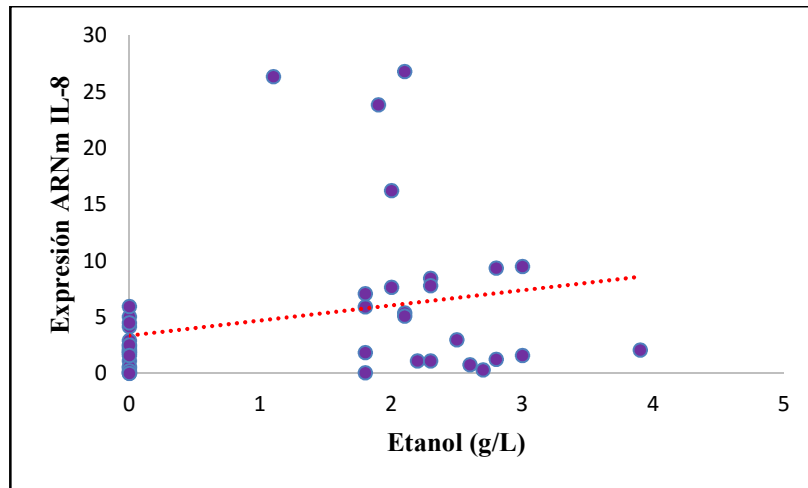


Figura 33: Correlación en sangre periférica entre los niveles de etanol de los casos y controles y la expresión del ARNm del IL-8.

DISCUSIÓN

Consideraciones metodológicas generales sobre nuestro trabajo

Diseño del estudio

Nuestro trabajo ha sido diseñado como un estudio transversal con casos y controles. En este estudio el investigador es un mero observador sin ejercer ningún tipo de influencia en el proceso¹⁰⁸ y nos permite determinar si existe asociación entre una enfermedad y variables potencialmente relacionadas¹⁰⁹. En nuestro caso, el objetivo del estudio fue analizar la relación entre la intoxicación alcohólica aguda y alteraciones en la expresión de ARNm de mediadores relacionados con la inflamación.

El diseño de un estudio de estas características requiere la identificación de dos grupos de sujetos que se diferencien en la presencia (casos) o ausencia (controles) de la enfermedad (en nuestro caso, la intoxicación alcohólica aguda), para posteriormente poder analizar diferencias en determinadas variables en ambos grupos. Debido a este diseño, se pueden producir diferentes sesgos en su realización, entre los que destacan los sesgos de selección de casos y controles y la presencia de factores o variables de confusión.

Uno de los puntos de mayor relevancia es la correcta selección de casos y controles, lo que permite evitar los sesgos de selección. En nuestro estudio, el método de identificación de los casos, en principio, no hace albergar dudas respecto a la correcta selección de los mismos ya que todos debían presentar como criterio de inclusión la clínica de intoxicación alcohólica y demostrar analíticamente niveles de etanol elevados en sangre. El único punto potencialmente relevante que podría llevar a sesgos, son las posibles diferencias en el patrón previo de consumo de alcohol, dado que la respuesta inflamatoria asociada al consumo intensivo de alcohol podría ser diferente en los sujetos

que presentan episodios repetidos (p. ej., cada semana) de *binge drinking* frente a aquellos que presentan episodios de forma esporádica o cuyo primer episodio fue precisamente el que motivó su inclusión en nuestro estudio. En este sentido, datos obtenidos en animales en la expresión de otros genes, sí han revelado una variación en los mismos con los episodios repetidos de *binge drinking*¹¹⁰. Este dato podría tener influencia, como veremos más adelante, en los resultados obtenidos en función del género.

En relación a la selección de controles, es importante que éstos sean representativos de la misma población que los casos y de características similares a ellos a excepción de en la enfermedad objeto de estudio. Por este motivo, suelen escogerse sujetos con distribución similar de características como sexo, edad o cualquier otra variable potencialmente relacionada con la enfermedad o con las variables objeto de estudio¹¹¹. De esta forma se consigue un aumento en la eficiencia estadística y una menor presencia de factores confusión¹¹². En nuestro estudio, resultó más difícil la inclusión de controles que de casos debido a la dificultad para encontrar sujetos en la edad seleccionada sin consumo de alcohol. Así, aunque inicialmente se planteó un diseño con casos autocontrolados, en donde cada individuo sirve como su propio control comparando la situación basal con la situación de intoxicación alcohólica¹⁰⁸, la colaboración por parte de los pacientes fue nula por diversos motivos cuando se les solicitó acudir de nuevo al hospital para realizar un análisis e sangre en situación basal. Por ello se decidió seleccionar una muestra de individuos para conformar el grupo de controles con criterios estrictos respecto al consumo habitual o previo de alcohol. Para ello recurrimos a voluntarios sanos, concretamente estudiantes de enfermería y de medicina que estuviesen formándose durante el periodo de tiempo del estudio en el Servicio de Urgencias o en el Servicio de Medicina Interna del CAUSA.

En relación con la presencia de sesgos de confusión, en el que una o varias variables relacionadas con el factor objeto de estudio y con la enfermedad pudieran alterar los resultados, se intentó disminuir este sesgo mediante el empleo de criterios estrictos de inclusión así como con la recogida de variables¹⁰⁸. Así, se definió como criterio de exclusión de los casos los pacientes que hubieran consumido otro tipo de drogas ilegales como heroína, anfetaminas, benzodiazepinas y cocaína valorando, través del análisis toxicológico de la orina y de la presencia o ausencia de clínica de intoxicación por sustancias de abuso: por ejemplo: midriasis, taquicardia sinusal o arritmia cardíaca, hipertensión arterial, hipertermia, producidas por anfetaminas y cocaína u otras drogas de diseño; miosis pupilar sugerente del consumo de heroína o alucinaciones, taquicardia o paranoia, sugerentes de cannabis. Asimismo, si en el momento de otorgar el consentimiento informado y durante el cuestionario administrado, los pacientes reconocían haber consumido otras drogas, no se les incluía en el estudio.

Pese a los criterios empleados para la inclusión de sujetos y la similitud en la edad entre ambos grupos, esta variable ha presentado diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, aunque no creemos que ello haya alterado de forma relevante los resultados dada la mínima diferencia existente y los resultados de la estratificación por edades. Desde el punto de vista del sexo, otro potencial factor de confusión, la distribución en la relación varón/mujer entre los casos y controles no fue estadísticamente significativa aunque la estratificación por edades sí que muestra los resultados de interés que se discutirán posteriormente. Finalmente, un posible sesgo del estudio es no haber considerado como factor de confusión el consumo de tabaco. Aunque algunos estudios apuntan que los fumadores presentan un incremento en niveles

circulantes de citocinas pro-inflamatorias (en particular IL-6)^{113,114}, otros autores no han encontrado esta asociación¹¹⁵.

Obtención y procesamiento de las muestras

La adecuada obtención de las muestras y la obtención de componentes a partir de ellas, como el ARN, es el proceso, después de la correcta selección de los participantes del estudio, más importante, ya que marca la reproducibilidad y la consistencia de los resultados posteriores de la RT-PCR. Por todo ello, es necesario cuantificar con precisión y evaluar la cantidad de ARN extraído antes de iniciar la transcripción reversa¹¹⁶. Para garantizar estas condiciones, se comprobó la recogida en los tubos de PAXgene Blood RNA™ de 2,5 ml de sangre para cada muestra junto con el tubo de heparina. El tubo PAXgene Blood RNA™ se mantuvo guardado hasta su procesamiento a una temperatura de -20° y el de heparina, para la obtención de las muestras de plasma, a -80°, como se ha explicado previamente en el apartado de Material y Métodos, fundamentalmente en las situaciones en las que las muestras eran recogidas los fines de semana y acceso al laboratorio no era inmediato. La cuantía y pureza del ARN obtenido, se determinó mediante un espectrofotómetro, calculando la absorbancia a 260 nm y el ratio de absorbancias a 260/280 nm, respectivamente¹¹⁷.

Resulta de interés mencionar aquí un posible sesgo en el trabajo que puede derivar del diferente periodo de tiempo en la obtención de las muestras. Mientras que las muestras de casos típicamente se recogieron por la noche o de madrugada, las muestras de controles se recogieron por la mañana. Dado que se han descrito variaciones circadianas en la secreción de citocinas pro-inflamatorias¹¹⁸, con importantes diferencias inter-individuales, este es un sesgo que potencialmente podría afectar a nuestro trabajo¹¹⁹.

Selección del gen de referencia

La RT-PCR es el método estándar para el estudio de los cambios relativos en la expresión génica de ARNm en diferentes tejidos y/o condiciones experimentales. Pero dada la variabilidad biológica entre los individuos en los que se obtiene las muestras *in vivo*, los errores derivados de las extracciones de las muestras, la calidad del ARN y la síntesis del ADNc, el análisis de la expresión génica del ARNm requiere la selección de un gen de referencia adecuado para cada tejido y condición experimental, garantizando así la bondad de los resultados del experimento¹²⁰. Existen numerosos estudios en la literatura científica en los que se demuestra que el uso inadecuado de genes de referencia puede llevar a encontrar resultados falsamente positivos o negativos^{121,122}.

Por todos estos motivos, se realizó un análisis, selección y validación del gen de referencia en la situación que corresponde a nuestro estudio: expresión del gen en muestras sanguíneas de pacientes *in vivo* con consumo de alcohol en forma de *binge drinking* o CIA y en pacientes sanos. Para ello se partió de la elección de genes de referencia que ya habían sido analizados en nuestro laboratorio y validados como genes de referencia¹⁰² en estudios previos, mediante los algoritmos GeNorm, NormFinder y BestKeeper^{123,124}.

El gen que se ha encontrado como más adecuado para emplearlo como referencia, la actina, ha sido también descrito en otros trabajos^{125,126}. Aunque su expresión en tejidos como el hígado puede verse influida por la presencia de enfermedad hepática alcohólica¹²⁷, no hemos encontrado datos experimentales que sugieran que se altere por el consumo de alcohol en sangre periférica. En nuestro conocimiento, nuestro estudio es el primero que analiza la expresión del ARNm en sangre periférica de los TLR empleando genes de referencia validados en las mismas muestras sanguíneas.

Optimización de la PCR

La técnica más utilizada para determinar los cambios en la expresión de uno o más genes a partir del ARN debido a su sencillez, bajo coste con alto rendimiento, su sensibilidad y especificidad, es la RT-PCR. Presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas como la PCR semi-cuantitativa, y por estos motivos fue la técnica elegida para la determinación de los niveles de ARNm¹²⁸ en nuestro estudio.

A pesar de su sencillez, la adecuada realización de la PCR es un punto clave para mejorar la sensibilidad, especificidad y reproductibilidad de la misma¹²⁹. Para garantizar estas condiciones, en nuestro estudio el protocolo de PCR se llevó a cabo con un control de calidad metodológico siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (del inglés *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*)¹³⁰. Así, se incluyó un control negativo en cada fila de la placa que contenía todos los componentes de la reacción excepto el ADN retrotranscriptivo, y todas las muestras fueron realizadas por duplicado, repitiéndose aquellas cuya desviación estándar entre duplicados fue mayor a 1. Además, se realizó una curva de fusión para cada uno de los genes utilizados verificando la ausencia de dímeros de primers. Finalmente, se realizó un test de Grubbs para comprobar la ausencia de valores extremos o outliers¹⁰⁷.

Expresión del ARNm de TLR1 en sangre periférica

Los resultados obtenidos entre la comparación de la expresión del ARNm del TLR1 de los casos y controles, revelaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El TLR1, que se encuentra en la membrana plasmática y cuyo ligando principal son diversos lipopéptidos bacterianos⁶⁹, forma heterodímeros con el TLR2 y el TLR6⁸¹, lo que concordaría con el resultado negativo encontrado también para TLR2. Aunque no existen datos previos para el consumo agudo de alcohol, en el alcoholismo crónico se ha mostrado un incremento en la expresión de dicho receptor, junto con los TLR2, 4, 6,7, 8 y 9¹³¹. Así, en un modelo experimental de ratones alimentados con la dieta Lieber-de-Carli, se observó además de inflamación hepática, un incremento en la expresión del ARNm de esos receptores en el hígado, así como valores elevados de TNF- α ^{81,84} en dicho tejido.

En relación con la ausencia de resultados significativos del presente trabajo, en primer lugar, es preciso considerar que nuestros hallazgos pueden traducir una ausencia de activación de la vía del TLR1 en el consumo agudo alcohol, o bien que su papel no sea relevante en comparación con otras vías. En ese sentido, es cierto que no existen datos previos que apoyen que los lipopéptidos que reconoce dicho receptor, y que podría suponer un estímulo para el incremento de su expresión, se encuentren elevadas en la intoxicación alcohólica aguda¹³². Sin embargo, también es cierto que otros estímulos, como el LPS en la línea celular de monocitos THP-1¹³³ como las propias citocinas inflamatorias como el TNF- α en otras líneas celulares han demostrado incrementar la expresión del TLR1¹³⁴.

Por tanto, es posible que la vía TLR1 sí se encuentre activada, pero que no se produzca un incremento de su expresión debido a la compleja regulación de la misma, o

bien que el incremento en su expresión sólo se produzca en determinados tipos celulares que expresan este receptor como macrófagos y neutrófilos¹³⁵. Dado que en nuestro trabajo hemos utilizado ARNm de sangre total, estamos limitados para detectar diferencias en tipos celulares concretos, al realizarse un análisis global sobre el conjunto de células sanguíneas. Finalmente, el hecho de que hayamos detectado un incremento de citocinas pro-inflamatorias, tanto a lo que se refiere a sus niveles circulantes como a su correspondiente ARNm en sangre periférica y considerando el efecto potencialmente sinérgico de la estimulación de los TLR en la expresión de dichas citocinas^{29,136}, no podemos descartar la implicación de esa vía en el alcoholismo agudo.

Expresión del ARNm de TLR2 en sangre periférica

Tras analizar y comparar la expresión del ARNm del TLR2 en sangre periférica en los casos y controles, se observó que no existían diferencias significativas entre ambos grupos, lo que indica que el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* no afectó a su expresión en nuestra muestra de pacientes con consumo agudo de alcohol.

Al revisar estudios previos sobre este tema, los hallazgos sobre la implicación de la vía del TLR2 en la respuesta inmune asociada al consumo de alcohol son contradictorios. En primer lugar, Pimentel-Nunes y cols¹³⁷ analizaron la respuesta del sistema inmune innato mediada a través de TLR2 y TLR4 en pacientes con hepatopatía alcohólica en donde demostraron una atenuación de la respuesta inmune mediada por el TLR2 pero no por el TLR4. Esta atenuación de la vía del TLR2 no parecía relacionada con una disminución en su expresión, ya que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de este receptor en monocitos circulantes entre los pacientes con hepatopatía alcohólica y los controles. De igual forma, los ratones *knockout* para el TLR2 no estuvieron protegidos frente al desarrollo de hepatopatía alcohólica, al contrario que los ratones *knockout* para TLR4¹³⁸. En relación con el consumo agudo de alcohol, Dolganiuc y cols⁹⁶ llegaron a conclusiones similares, ya que al analizar la respuesta ante el consumo agudo de alcohol del TLR4 y TLR2, este último no se vio influenciado en su expresión ni se alteró a capacidad de reclutamiento hacia las *lipid rafts*.

Sin embargo, otros trabajos realizados también en modelos animales, ya mencionados previamente, sí muestran un papel para TLR2 en el daño causado por consumo excesivo de alcohol^{81,84}. Asimismo, Pascual y cols⁹¹, comprobaron que en el córtex prefrontal de ratas adolescentes sometidas a una exposición de alcohol en forma

de *binge drinking*, los niveles de ARNm tanto del TLR4 como del TLR2 estaban elevados en comparación con ratas que habían sido tratadas con suero salino. La posible explicación, precisamente, es que el alcohol reclute tanto al TLR4 como al TLR2 a las *lipid rafts*, activándose así su cascada de producción de citocinas pro-inflamatorias. Estos hallazgos se reforzaron en otro estudio del mismo grupo, con más evidencias a favor de esta sobreexpresión del TLR2 y TLR4 a nivel cerebral en el alcoholismo crónico, provocando neuroinflamación y daños en el comportamiento que pueden persistir en el tiempo⁸⁶. Finalmente, estudios en monocitos humanos, mostraron que la estimulación concomitante con ligandos de TLR2 y TLR4 incrementó la respuesta inflamatoria tras la exposición aguda a etanol⁷², lo que enlaza con el sinergismo en la estimulación de diferentes receptores TLR para la producción de citocinas pro-inflamatorias¹³⁶.

Por otro lado, en relación con la inmunosupresión asociada al consumo de alcohol, Kristina y cols¹³⁹ realizaron un estudio para determinar los niveles de expresión del receptor TLR2 a diferentes concentraciones de alcohol. De esta forma, demostraron que los niveles de ARNm del TLR2 en células bronquiales se incrementaban ante dosis altas de alcohol, aunque el mecanismo por el que el alcohol producía dicho efecto es desconocido.

El TLR2 es un receptor cuyo principal ligando son estructuras correspondientes a bacterias Gram positivas, como el peptidoglicano y diversas lipoproteínas, además de estructuras de hongos y virus^{140,141}. Al igual que con el TLR1, la ausencia de diferencias significativas puede deberse en primer lugar a que este receptor no desempeñe un papel relevante en la respuesta inmune ante el consumo agudo de alcohol. En este sentido, y al igual que ocurre con el TLR1, tampoco ha sido estudiada la presencia en sangre de ligandos del TLR2 tras el consumo agudo o crónico de alcohol, pero también se ha

comprobado el incremento en la expresión del TLR2 en experimentos *in vitro* con el estímulo con LPS o citocinas pro-inflamatorias^{133,134}. Por tanto, y del mismo modo que comentábamos con el receptor TLR1, es posible también que dado que realizamos el análisis sobre sangre total no sea posible detectar el incremento de expresión de TLR2 en tipos celulares más específicos como los monocitos o las células dendríticas, mientras que estudios realizados en células de la microglía sí que han podido detectar el incremento de TLR2 tras episodios de *binge drinking*.

La expresión del TLR2 parece, en todo caso, depender del tejido analizado, del origen de la muestra y del patrón de exposición al alcohol, así como del carácter *in vivo* o *in vitro* del experimento. Aunque nuestros hallazgos muestran una ausencia de incremento de expresión del TLR2 en el *binge drinking*, no resulta posible tampoco descartar un papel para la activación de esa vía en el alcoholismo agudo. La ausencia de datos previos en un contexto similar hace necesario futuros estudios analizando tipos celulares específicos que permitan determinar el papel exacto del TLR2 en el consumo intensivo de alcohol.

Expresión del ARNm de TLR4 en sangre periférica

Uno de los principales hallazgos del presente estudio se centra en la vía del TLR4 y en la demostración de la capacidad de inducción de la respuesta inflamatoria mediada por TLR4 producido por el *binge drinking*. Esta afirmación se basa, en primer lugar, en la detección del incremento de la expresión del ARNm en sangre periférica del TLR4 en los casos frente a los controles, así como en el incremento de citocinas pro-inflamatorias. Al diferenciar por sexos, observamos cómo tanto en varones como en mujeres está incrementada dicha expresión, pero sólo en mujeres es significativa. Por último, y como probable consecuencia de la activación de dicho receptor, encontramos niveles de citocinas en plasma incrementados y un aumento en la expresión del ARNm de determinadas citocinas, observando de nuevo diferencias entre sexos, siendo mayores las concentraciones en mujeres que en varones.

Niveles de ARNm del TLR4

El TLR4, como hemos ido exponiendo a lo largo de todo nuestro trabajo, es el principal TLR relacionado con la respuesta inmune desencadenada por el consumo crónico de alcohol^{76,81,131}, especialmente por lo que se refiere al desarrollo de la hepatopatía alcohólica. Nuestro trabajo confirma además resultados previos que apuntaban hacia una implicación del TLR4 en el consumo agudo de alcohol. Así, aunque no se hubiera analizado directamente la expresión de ARNm de TLR4 en situación de intoxicación etílica aguda, existían datos previos que sugerían la activación de esta vía tras el consumo agudo de alcohol. El reciente trabajo de Bala y cols⁶⁴ demostró que en voluntarios sanos, tras la administración de una dosis elevada de alcohol, se producía un aumento de los niveles de LPS en plasma y de otras proteínas

relacionadas (LBP y sCD14). Estos datos apoyarían la hipótesis de que al estar elevados los niveles de endotoxina en plasma, éstos se unirían al TLR4⁷⁶ e iniciaría así la cascada de activación pro-inflamatoria, dando lugar a un incremento en las citocinas plasmáticas, situación similar a lo que ocurre en el consumo crónico de alcohol³⁹. Sin embargo, Jong y cols⁹⁷ publicaron en 2015 los resultados de su estudio en el que demostraron cómo el consumo agudo de alcohol en pacientes sanos, a los que se les administró una cantidad de vino al 12% correspondiente a 1g/kg y una concentración media de alcohol en sangre de 0,7 g/L, alteraba la integridad de la pared intestinal pero sin producirse un incremento significativo en las proteínas de fase aguda LBP y sCD14, utilizadas para medir indirectamente la traslocación de LPS. Aunque estos hallazgos podrían contradecir lo expuesto anteriormente, hay que matizar que en este estudio, las cantidades administradas de alcohol fueron ligeramente menores con respecto al estudio de Bala y cols (que empleó 2 ml de vodka al 40% por kg de peso, alcanzando una concentración media de alcohol en sangre de 0,8 g/L), y que el estudio de Jong y cols⁹⁷ se realizó sólo en varones, mientras que en el estudio de Bala y cols⁶⁴ se incluyeron tanto varones como mujeres, comprobándose un incremento de LPS mayor en mujeres que en varones. Esta diferencia entre ambos estudios resulta particularmente relevante ya que, como veremos posteriormente, la respuesta pro-inflamatoria al consumo de alcohol en mujeres es mayor que en varones. Otro estudio, realizado por Asfhar y cols⁵⁹, mostró en voluntarios sanos, tanto en varones como en mujeres, a los que se les administró una bebida al 50% de alcohol, con una concentración media de alcohol resultante de 1,29 g/L, una respuesta pro-inflamatoria temprana, seguida de un estado de inmunosupresión (efecto bifásico). En todo caso, resulta difícil correlacionar cualquiera de estos estudios con nuestros propios datos, dado que las concentraciones de alcohol

alcanzadas en sangre fueron mucho mayores tras los episodios de intoxicación etílica aguda.

Resulta de interés también considerar que, por un lado, se ha descrito que la estimulación únicamente con LPS puede producir un descenso en la expresión de TLR4 de membrana, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Sin embargo, la activación de diversas vías inflamatorias y la expresión de citocinas como el IFN- γ parecen capaces de incrementar la expresión de este receptor¹⁴², lo que concuerda con el resultado de nuestro trabajo.

Además de estos trabajos realizados en humanos tras consumo agudo alcohol, el incremento significativo en la expresión del TLR4 como consecuencia de un episodio aislado de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* se ha descrito también en modelos animales que permiten vincularlo con el proceso de neuroinflamación. Pascual y cols⁹¹ demostraron un incremento en la expresión del TLR4 en el córtex prefrontal en un modelo animal tras la administración aguda de alcohol provocando neuroinflamación y desmielinización. Similares resultados obtuvieron Vetreno y cols^{92,143}, relacionándolo con una reducción en el desarrollo del hipocampo y con un posible aumento en el riesgo de desarrollar alcoholismo¹⁴³. En la misma línea, Montesinos y cols^{144,145} estudiaron en ratones adolescentes, cómo a través de la señal del TLR4, elevada en el consumo agudo de alcohol, se inducía una respuesta inflamatoria responsable del daño cerebral, disfunción cognitiva¹⁴⁴ y ansiedad⁹³ en el adolescente.

Expresión del TLR4 en relación con la edad

Al analizar la posible interacción en la expresión del TLR4 por la edad, nos hemos encontrado con una relación inversa entre ambas variables, es decir, que a menor

edad, mayor expresión del TLR4. Estos hallazgos concuerdan con la evidencia acumulada que muestra una mayor sensibilidad a ciertos efectos del alcohol en adolescentes y adultos jóvenes, tanto en modelos animales, como en estudios en humanos^{142,146,147}. Así, diversos estudios demuestran la capacidad del alcohol de activar el sistema inmune en el cerebro a través del TLR4 en particular durante este periodo de tiempo, produciendo un efecto pro-inflamatorio que daña el sistema nervioso central¹⁴⁸. Tras administrar de forma intermitente alcohol como *binge drinking* a ratas adolescentes¹⁴⁹ o ratones¹⁴⁴, se producen lesiones a nivel del córtex prefrontal dañando las estructuras miélicas y la sinapsis¹⁴⁴, así como alteraciones cognitivas^{144,149} que no aparecen cuando genéticamente se elimina el TLR4 de dichos animales, demostrando así la implicación clave del TLR4 en este proceso. En modelos animales, se ha encontrado también una mayor sensibilidad a los efectos de recompensa del etanol en individuos adolescentes, pero no así a determinados efectos de interacción social¹⁵⁰.

Por lo tanto, con las limitaciones que los estudios que demuestran más claramente la mayor sensibilidad a los efectos pro-inflamatorios del alcohol en la adolescencia han sido realizados en animales, el hecho de que el TLR4 esté más elevado en pacientes jóvenes se podría explicar por esta mayor sensibilidad al consumo de alcohol.

Relación entre la expresión del TLR4 y el sexo

El efecto diferencial del alcohol en función del género es conocido desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, se ha observado cómo la hepatopatía alcohólica se desarrolla más rápidamente en las mujeres que en los varones y con menor dosis de alcohol^{151,152}, diferencia que se explica en parte, porque en la mujer existe una menor actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa gástrica, primer paso del metabolismo

del alcohol¹⁵³. En esta misma línea, pero en relación con la neuroinflamación tras el consumo crónico de alcohol, Alfonso-Loeches y cols⁸⁹ realizaron un trabajo analizando el tejido cerebral de ratones *knockout* TLR4. Este trabajo no sólo mostró el papel fundamental del eje alcohol-TLR4 en el desarrollo de neuroinflamación asociada al consumo crónico de alcohol, sino que también detectaron que los ratones hembras eran más vulnerables al efecto pro-inflamatorio del consumo de alcohol, observándose mayores niveles de citocinas inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y una mayor degeneración cerebral o gliosis.

En relación con el consumo agudo de alcohol, ya hemos mencionado el trabajo de Bala y cols⁶⁴, donde se describió cómo los niveles séricos de endotoxina a las 4 horas del consumo agudo de alcohol, fueron significativamente más altos en las mujeres que en los varones, además de observar cómo el descenso del nivel de alcohol en sangre fue también más lento. Esta diferencia puede por tanto explicar en parte los resultados del trabajo realizado por Jon y cols⁹⁷, quienes evidenciaron que tras la ingesta aguda de alcohol en varones, los niveles de LPS no estaban incrementados significativamente. Recientemente, Engler y cols¹⁵⁴ mostraron que las mujeres presentaban tras la administración intravenosa de LPS una respuesta pro-inflamatoria mayor que los varones.

Debido a la existencia de estos datos previos, analizamos la expresión del TLR4 en varones y mujeres tras un consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*. Los resultados muestran un incremento significativo de los niveles en sangre del ARNm del TLR4 de las mujeres con intoxicación etílica frente a las mujeres controles. Sin embargo, aunque los niveles del ARNm del TLR4 también estaban incrementados entre los varones casos y los varones controles, esta diferencia no era significativa. Estos resultados concuerdan además con las diferencias encontradas recientemente al analizar

la respuesta al *binge drinking* en ratones *knockout* para TLR4 de ambos sexos, siendo esta mayor y significativa en los del sexo femenino, como se detalla posteriormente¹⁵⁵. Aunque no podemos descartar que la ausencia de diferencias significativas en varones se deba a que la magnitud del efecto es menor y no pueda detectarse debido al bajo tamaño muestral, sí parece claro que nuestros resultados extienden la generalidad de los datos previos sobre el consumo crónico que apoyan claramente la mayor vulnerabilidad de la mujer ante los efectos del consumo agudo de alcohol.

Expresión de ARNm de citocinas pro-inflamatorias y análisis de citocinas en plasma

Una vez analizada la expresión de los diferentes TLR en sangre periférica, se examinó la expresión de citocinas resultantes de la activación o no de dichos receptores tanto a nivel de ARNm como de citocinas solubles en plasma. En relación con los niveles de citocinas plasmáticas, en las mujeres con intoxicación etílica, los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, INF- γ , fractalquina, MCP-1 y MIP-1 α , se encontraron incrementados significativamente con respecto a las mujeres controles. Sin embargo, en los varones, sólo se detectaron aumentados significativamente los niveles de IL-4, IL-6, CSF y fractalquina. Respecto a la expresión de ARNm, los niveles de ARNm de IL-1 β en sangre periférica fueron también significativamente más altos en las mujeres con intoxicación etílica que en los controles, no siendo así en los varones y tampoco en la comparación de la totalidad de las muestras de casos y controles. En el caso de la IL-8, la expresión del ARNm estaba incrementada significativamente en los casos frente a los controles, existiendo diferencias entre hombre y mujeres al estratificar por sexo: mientras que en las mujeres la diferencia sí fue significativa, no así en varones. Por lo tanto, todos estos resultados van en consonancia con los descritos previamente en el apartado de la discusión del incremento de la expresión del TLR4, y orientan hacia una mayor sensibilidad de las mujeres a la ingesta aguda de alcohol.

Asimismo, estos resultados encontrados en pacientes con intoxicación etílica, se ven reforzados por los hallazgos sobre un modelo experimental de ratones adolescentes a los que se les administró intermitentemente alcohol, siguiendo los mismos patrones de consumo que en los humanos¹⁵⁵. En este trabajo, los niveles en suero de citocinas estaban incrementados significativamente en ratones hembras que habían sido tratadas

con alcohol frente a las que lo habían hecho con suero salino, y no así en los machos. También se llevó a cabo una evaluación de la expresión del TLR4 y de las citocinas en el córtex prefrontal, donde, nuevamente, estaban incrementados significativamente dichos niveles en ratones hembras tratadas con alcohol, y no así en los ratones machos. Por último, se evaluaron los niveles de citocinas tanto en sangre periférica como en el córtex prefrontal de ratones *knockout* para TLR4 tratados con etanol, observándose que no había cambios significativos en dichos niveles ni en ratones machos ni en hembras. Esto reafirma el papel del TLR4 en la activación del sistema inmune innato mediado por el consumo agudo de alcohol.

En la línea de nuestros hallazgos, Engler y cols¹⁵⁴ también detectaron niveles de citocinas en sangre periférica elevados con diferencias entre sexos tras la administración intravenosa de LPS en sangre ya que en las mujeres estaban incrementados significativamente los niveles de TNF- α e IL-6, mientras que en los varones se encontró un mayor incremento de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Ward y cols¹⁵⁶, en un intento de buscar una relación entre los cambios que se producen a nivel periférico con las alteraciones en determinadas regiones cerebrales, llegaron a conclusiones algo dispares respecto a las mencionadas: en un modelo animal los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) estaban elevados en la microglía, y en sangre periférica de ratones jóvenes sometidos a *binge drinking*, mostrando los machos un incremento significativo de los valores del TNF- α frente a los controles, mientras que en hembras estos valores eran significativamente inferiores con respecto a los controles. También constataron en el plasma niveles elevados de IL-6 y disminuidos de IL-10, aunque estos valores no alcanzaron a ser significativos.

Recientemente, y centrándonos en el impacto del alcohol en el desarrollo cerebral, el grupo de la Dra. Guerri (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)

ha publicado varios estudios en los cuales, como hemos mencionado previamente, el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* provoca un efecto inflamatorio. Concretamente, estos investigadores han observado una elevación en los valores del TNF- α , IL-1 β en el córtex prefrontal al comparar ratones no modificados genéticamente frente a ratones *knockout* para el TLR4⁹¹. También se ha relacionado la expresión del TLR4 con los niveles de etanol en sangre, analizando la respuesta de macrófagos peritoneales sometidos a diferentes concentraciones de etanol. De esta forma, mientras las concentraciones bajas/moderadas en sangre de alcohol inducían la expresión del TLR4, y como consecuencia efecto inflamatorio (elevación del TNF- α , IL-1 β e IL-12 β), niveles altos de etanol en sangre inhibían la capacidad de activación de dicho receptor¹⁵⁷. Estos hallazgos son superponibles a los detectados indirectamente en nuestro estudio, porque aunque el diseño de éste no se realizó para determinar la relación entre el nivel de alcohol en sangre y la expresión de citocinas, cuando analizamos la línea de regresión entre estos parámetros, observamos cómo, para ambos géneros, existe una fuerte correlación. Sin embargo, con niveles elevados en sangre, como por ejemplo, por encima de 3 g/L, la detección de citocinas en sangre es menor que por ejemplo con niveles de 2 g/L de etanol. Este efecto paradójico de concentraciones elevadas de alcohol, puede ser explicado por el efecto bifásico de esta sustancia en la activación del TLR4, ya que a concentraciones elevadas puede alterar las estructuras de las *lipid rafts*¹⁵⁸ impidiendo la activación de su cascada inflamatoria, mientras que a concentraciones bajas o moderadas, produce una activación de dicho receptor. Nuestro estudio no nos permite determinar cuál sería el nivel de etanol en sangre en el que se produce ese punto de inflexión de activación a inhibición del sistema inmune innato, resultando difícil diseñar un estudio que valore este apartado dadas las

consideraciones éticas que implica promover la ingesta de una cantidad muy elevada de etanol.

En todo caso, resulta de particular interés este posible efecto bifásico debido a que los estudios previos realizados en este ámbito se han centrado principalmente el efecto anti-inflamatorio del alcohol. Así, aunque resulta claro a la luz de nuestros datos y de otros trabajos previos que el consumo agudo de alcohol induce una respuesta inflamatoria aguda tanto en sangre como a nivel cerebral, existen numerosos estudios que han mostrado el efecto anti-inflamatorio del consumo agudo de alcohol. Así, Szabo y cols⁶³ demostraron el descenso de la producción de IL-6 e IL-12 y el incremento de la IL-10 en estudios realizados en monocitos humanos *in vitro*. Estos datos también se observaron en el trabajo de Pruett y cols^{68,75}, explicándolo por la capacidad inhibitoria del alcohol sobre el TLR4, al alterar la estructura de las *lipid rafts* y su capacidad para el reclutamiento de los receptores necesarios para su activación⁷³. Aunque estos estudios han sido realizados *in vitro*, este efecto bifásico que el alcohol ejerce sobre el sistema inmune también ha sido encontrado, como hemos mencionado previamente, en el estudio de Afshar y cols⁵⁹. En su trabajo utilizaron voluntarios sanos que consumieron alcohol, cumpliendo los criterios de la NIAAA que definen *binge drinking*, y determinaron niveles de citocinas y conteo de diferentes tipos celulares en sangre periférica a los 20 minutos, a las 2 y 5 horas posteriores de la ingesta. Así, observaron cómo a los 20 minutos existía un incremento en la circulación de leucocitos, monocitos y células *natural killer*, con una mayor sensibilidad a LPS y capacidad de producción de TNF- α . Sin embargo a las 2 y 5 horas de la ingesta, cuando los niveles de alcohol se habían reducido entre un 40-70%, los sujetos mostraron una reducción en la circulación de los monocitos y de las células *natural killer*, una capacidad de inducción por LPS menor y un incremento en la producción de la IL-10. Por lo tanto, estos datos muestran

cómo un único episodio de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* ejerce un efecto temprano pro-inflamatorio sobre el sistema inmune innato seguido en el tiempo de una respuesta anti-inflamatoria. Podríamos relacionar los resultados de ambos estudios y los nuestros, teniendo en cuenta en primer lugar que el nivel de alcoholemia fue mucho más bajo en el estudio de Asfhar (la media de la concentración de alcohol en sangre en su nivel más alto fue de 1,29g/L) que en nuestro trabajo (media de alcohol en sangre de 2,37g/L). Así mismo, en nuestro estudio el consumo de alcohol se realizó con toda probabilidad durante un periodo de tiempo prolongado en lugar de como dosis única, siendo la extracción de sangre realizada en un punto diferente para cada paciente.

Es de destacar que en nuestro trabajo no hemos encontrado un incremento en los niveles plasmáticos de TNF- α o de su ARNm, tanto en casos frente a controles o en los grupos de mujeres o de varones, al contrario de lo que cabría esperar por los resultados de las otras citocinas y por estudios previos que muestran el papel clave del TNF- α en la inflamación asociada al consumo crónico de alcohol¹⁵⁹. Aunque no podemos elaborar una hipótesis clara para explicar este resultado, el efecto combinado de la exposición aguda a etanol y a LPS activa de forma potencial numerosas vías inflamatorias así como mecanismos de regulación anti-inflamatorios que pueden determinar finalmente el hallazgo encontrado. Los estudios realizados *in vitro* no abarcan la complejidad del modelo en humanos de intoxicación alcohólica, pero la exposición aguda a etanol en monocitos humanos inhibió la transcripción de los genes del factor NF- κ B, y por tanto la producción del TNF- α ⁶³. Al mismo nivel, también *in vitro*, al exponer a etanol macrófagos procedentes de sangre periférica a diferentes dosis y periodos de tiempo, la exposición crónica elevaba la producción de proteínas de estrés como hsp90, que estimulaba a su vez la transcripción del gen de NF- κ B, y por tanto aumentaban los niveles de TNF- α . Sin embargo, cuando la exposición al etanol era de forma aguda, la

proteína de estrés que se elevaba era la hsp70 que inhibía la expresión del gen NF- κ B⁷⁸. Además de la posible influencia del etanol sobre la expresión de TNF- α a nivel transcripcional, existen también estudios *in vitro* de líneas celulares humanas, en los que se relacionan los valores bajos del TNF- α en sangre periférica en el consumo agudo de alcohol, porque esta sustancia, a concentraciones elevadas, es capaz de inhibir la enzima de conversión del TNF- α (TACE), encargada de liberar dicha citocina al plasma sanguíneo^{160,161}. Estos trabajos muestran la complejidad de la regulación de la expresión de TNF- α en el consumo agudo de alcohol y la posibilidad de que estímulos claramente pro-inflamatorios como el incremento de LPS se contrarresten por otros mecanismos pro-inflamatorios.

Como consecuencia de todos estos datos y de la revisión de los estudios previos, podemos afirmar por tanto, que los episodios de intoxicación etílica provocan en mujeres jóvenes un claro efecto pro-inflamatorio en sangre periférica mediado principalmente por TLR4 y determinado por un incremento de numerosas citocinas en plasma, lo que puede estar asociado con la neuroinflamación inducida por *binge drinking*. Sin embargo, el efecto del consumo agudo de alcohol sobre el sistema inmune es de gran complejidad, y resulta difícil en nuestro estudio valorar la implicación de otras vías distintas del TLR4, así como el posible efecto inhibitorio sobre la respuesta inmune del consumo de alcohol. Es posible, por tanto, que en función de la cantidad y del patrón del consumo de alcohol así como del tiempo transcurrido desde el consumo, que pueda producirse también un efecto anti-inflamatorio o, al menos, de supresión de la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes sometidos a CIA o *binge drinking* presentan una activación de la respuesta inmune innata o estado pro-inflamatorio mediado, al menos en parte, por la vía del receptor TLR4. Ello se manifiesta por un incremento en sangre periférica, respecto a controles sanos, de la expresión de ARNm de dicho receptor y de los niveles plasmáticos y de ARNm de citocinas pro-inflamatorias.
2. La expresión del ARNm de TLR1 y de TLR2 no es diferente en casos con CIA o *binge drinking* respecto a controles.
3. La expresión de ARNm de la IL-8 en sangre periférica fue significativamente mayor en casos con CIA que en los controles y también en el grupo de las mujeres frente a sus controles. La expresión de ARNm de la IL-1 β fue significativamente mayor sólo en el grupo de las mujeres con CIA. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de valores del ARNm del TNF- α entre los casos y los controles.
4. Las mujeres presentan una mayor respuesta pro-inflamatoria que los varones tras un episodio de CIA o *binge drinking*.
5. Se detectaron niveles elevados en plasma de citocinas y quimiocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, INF- γ , fractalquina, MCP-1 y MIP-1 α) en las mujeres con CIA o *binge drinking* frente a las mujeres controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En varones con CIA, sólo se detectaron incrementadas significativamente frente a los controles, la IL-4, la IL-6, CSF y la fractalquina.

BIBLIOGRAFÍA

1. McGovern PE, Zhang J, Tang J, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17593-8.
2. *Ibíd.*, p. 36-66.
3. Usó JC. El Abstemio y la «Liga Antialcohólica Española» (1910-1915): Una cruzada frustrada. *Revista del Ateneo de Castellón*. 1996;9:17-24.
4. Valencia Martin JL, Gonzalez MJ, Galan I. Aspectos metodologicos en la medicion del consumo de alcohol: la importancia de los patrones de consumo. *Revista espanola de salud publica* 2014;88:433-46.
5. World Health Organization. Global status report on alcohol and health- 2014. 2014. (Consultado 8-10-2014). Disponible en <http://www.who.int/iris/handle/10665/112736>.
6. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Europea de salud en España 2009. 2011. (Consultado el 15-10-2014). Disponible en www.ine.es.
7. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría del Estado de Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional de Drogas. Encuesta sobre el alcohol y drogas en España (EDADES) 2013-2014. 2015. (Consultado el 10-2-2016). Disponible en www.pnsd.msc.es.
8. Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Informe de la encuesta Estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES) 2014-2015; 2016.(Consultado el 15-3-2016). Disponible en www.pnsd.msc.es.
9. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría del Estado de Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional de Drogas. Encuesta sobre el alcohol y drogas en población general en España (EDADES) 2011-2012. 2013. (Consultado el 8-10-2014). Disponible en www.pnsd.msc.es.
10. Galan I, Gonzalez MJ, Valencia-Martin JL. Patrones de consumo de alcohol en España: un país en transición. *Revista española de salud pública*. 2014;88:529-40.
11. Bloomfield K, Stockwell T, Gmel G, Rehn N. International comparisons of alcohol consumption. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2003;27:95-109.
12. Red de Planes sobre Drogas de Castilla y León. El fenómeno del "botellón". Documento de trabajo 2006. (consultado el 10-11-2014). Disponible en www.jcyl.es

13. Baigorri A, Chaves M. Botellón: más que ruido, alcohol y drogas (La Sociología en su papel). *Anduli, Revista andaluza de ciencias sociales*. 2006;6:159-73.
14. Navarrete L. *Juventud y drogas: 4 estudios sociológicos comparados*. Madrid: Ilustre Colegio Nacional de Doctores y Licenciados en Ciencias Políticas y Sociología; 2004.
15. Álvarez Gil D, Cueto Marcos D, Garcia Zuazua A. El fenómeno del botellón. *Psicología de las Adicciones* 2012;1:45-9.
16. Biagorri A, Chaves M. Botellón: más que ruido, alcohol y drogas (la sociología en su papel). *Revista Andaluza de Ciencias Sociales* 2006;6.
17. Courtney KE, Polich J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychological bulletin* 2009;135:142-56.
18. Fillmore MT, Jude R. Defining "binge" drinking as five drinks per occasion or drinking to a .08% BAC: which is more sensitive to risk? *The American journal on addictions / American Academy of Psychiatrists in Alcoholism and Addictions*. 2011;20:468-75.
19. Parada M, Corral M, Caamano-Isorna F, et al. Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking). *Adicciones*. 2011;23:53-63.
20. Wechsler H, Dowdall GW, Davenport A, Rimm EB. A gender specific measure of binge drinking among college students. *Am J Public Health* 1995;85:982-5.
21. White A, Krauss CL, Swaetzwelder H. Many college freshmen drink at levels far beyond the binge threshold. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006;30:1006-10.
22. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud de España 2011/12 (ENSE 2011/2012). (Disponible en www.ine.es).
23. Vik PW, Tate SR, Carrello P. Detecting college binge drinkers using an extended time frame. *Addictive behaviors*. 2000;25:607-12.
24. Baer JS, Kivlahan DR, Blume AW. Brief intervention for heavy-drinking college students: 4-year follow-up and natural history. *Am J Public Health*. 2001;91:130-16.
25. Wechsler H, Davenport A, Dowdall G, Moeykens B, Castillo S. Health and behavioral consequences of binge drinking in college. A national survey of students at 140 campuses. *Jama*. 1994;272:1672-77.

26. Soler-Vila H, Galan I, Valencia-Martin JL, Leon-Munoz LM, Guallar-Castillon P, Rodriguez-Artalejo F. Binge drinking in Spain, 2008-2010. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014;38:810-9.
27. World Health Organization. *The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. 2002. (consultado el 10-10-2014). Disponible en www.who.int/whr/2002/en/.
28. World Health Organization. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Geneva: World Health Organization; 1992. (Consultado en 10-10-2104). Disponible en <http://www.who.int/iris/handle/10665/37958>.
29. World Health Organization. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research*. Geneva: World Health Organization; 1993. (consultado en 10-10-2014). Disponible en <http://www.who.int/classifications/icd/en/GRNBOOK.pdf>.
30. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ (Clinical research ed)* 1996;312:731-6.
31. Booyse FM, Parks DA. Moderate wine and alcohol consumption: beneficial effects on cardiovascular disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86:517-28.
32. Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *Jama*. 2003;289:579-88.
33. Howard AA, Arnsten JH, Gourevitch MN. Effect of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review. *Annals of internal medicine*. 2004;140:211-9.
34. Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes care* 2005;28:719-25.
35. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, et al. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *The New England journal of medicine*. 1997;337:1705-14.
36. Mohamed AE, Kew MC, Groeneveld HT. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban southern African blacks. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1992;51:537-41.
37. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Jama* 1999;281:1632-7.

38. Sokol RJ, Clarren SK. Guidelines for use of terminology describing the impact of prenatal alcohol on the offspring. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1989;13:597-8.
39. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. Sistema inmune y enfermedad hepática por alcohol. *Medicina clinica*. 2005;125:263-9.
40. Chamorro Fernández AJ, Marcos Martín M, Laso Guzmán FJ. Encefalopatía de Wernicke en el paciente alcohólico. *Revista Clinica Española*. 2011, 211:458-463.
41. Chamorro Fernández AJ, Marcos Martín M. Proyecto Wernicke-SEMI: estudio multicéntrico y retrospectivo sobre la encefalopatía de Wernicke. *Galicia Clínica*. 2012, 73:105-108
42. Hall RC, Platt DE, Hall RC. Suicide risk assessment: a review of risk factors for suicide in 100 patients who made severe suicide attempts. Evaluation of suicide risk in a time of managed care. *Psychosomatics*. 1999;40:18-27.
43. Pastore DR, Fisher M, Friedman SB. Violence and mental health problems among urban high school students. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 1996;18:320-4.
44. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según causa de muerte 2011. Resultados nacionales. (Consultado 20-1-2015). Disponible en :<http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t15/p417/a2011/10/&file=01000.px&type=pcaxis&L=0>.
45. Sassi F. (2006). Calculating QALYs, comparing QALY and DALY calculations. *Health Policy Plan*. 21:402-408.
46. Catala-Lopez F, Genova-Maleras R, Alvarez-Martin E, Fernandez de Larrea-Baz N, Morant-Ginestar C. Carga de enfermedad en adolescentes y jóvenes en España. *Revista de psiquiatria y salud mental*. 2013;6:80-5.
47. Valencia-Martin JL, Galan I, Rodriguez-Artalejo F. The joint association of average volume of alcohol and binge drinking with hazardous driving behaviour and traffic crashes. *Addiction (Abingdon, England)* 2008;103:749-57.
48. Watt K, Purdie DM, Roche AM, McClure RJ. Risk of injury from acute alcohol consumption and the influence of confounders. *Addiction (Abingdon, England)* 2004;99:1262-73.
49. Folgar MI, Rivera FF, Sierra JC, Vallejo-Medina P. Binge drinking: conductas sexuales de riesgo y drogas facilitadoras del asalto sexual en jóvenes españoles. *Suma Psicológica* 2015;22:1-8.

50. Mahía FC. Impacto del consumo de alcohol en forma de atracón sobre las capacidades inhibitorias de adolescentes consumidores. *Trastornos Adictivos*. 2011;13:10-4.
51. Pulido J, Indave-Ruiz BI, Colell-Ortega E, Ruiz-García M, Bartroli M, Barrio G. Estudios poblacionales en España sobre daños relacionados con el consumo de alcohol. *Revista española de salud pública* 2014;88:493-513.
52. Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, Sempos CT. The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction (Abingdon, England)* 2003;98:1209-28.
53. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 1999;34:830-41.
54. Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2008;42:237-47.
55. Gunzerath L, Faden V, Zakhari S, Warren K. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2004;28:829-47.
56. Morris NL, Ippolito JA, Curtis BJ, et al. Alcohol and inflammatory responses: Summary of the 2013 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2015;49:1-6.
57. Griffin R, Poe AM, Cross JM, Rue LW, McGwin G, Jr. The association between blood alcohol level and infectious complications among burn patients. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2009;30:395-9.
58. Molina PE, Sulzer JK, Whitaker AM. Alcohol abuse and the injured host: dysregulation of counterregulatory mechanisms review. *Shock (Augusta, Ga)* 2013;39:240-9.
59. Afshar M, Richards S, Mann D, et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2015;49:57-64.
60. Ippolito JA, Curtis BJ, Choudhry MA, Kovacs EJ. Alcohol and immunology: Summary of the 2012 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2013;47:589-93.
61. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. Sistema inmune y enfermedad hepática alcohólica. *Med Clin (Barc)* 2005;125:263-9.

62. Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2006;30:135-9.
63. Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2009;33:220-32.
64. Bala S, Marcos M, Battu A, Catalano D, G S. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PloS one* 2014;9.
65. Pruett SB, Fan R, Cheng B, Glover M, Tan W, Deng X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2010;117:314-24.
66. Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, et al. Decreased peripheral blood CD4+/CD25+ regulatory T cells in patients with alcoholic hepatitis. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2013 37:361-9.
67. Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, et al. Altered Distribution of Peripheral Blood Maturation-Associated B-Cell Subsets in Chronic Alcoholism. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2015 ;39:1476-84.
68. Pruett SB, Zheng Q, Fan R, Matthews K, Schwab C. Acute exposure to ethanol affects Toll-like receptor signaling and subsequent responses: an overview of recent studies. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2004;33:235-9.
69. De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 2015;74:181-9.
70. Moreno C, Sanchez-Ibarrola A. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. 2003.
71. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews Immunology* 2013;13:453-60.
72. Oak S, Mandrekar P, Catalano D, Kodys K, Szabo G. TLR2- and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006;176:7628-35.
73. Szabo G, Dolganiuc A, Dai Q, Pruett SB. TLR4, ethanol, and lipid rafts: a new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007;178:1243-9.

74. Perkins DJ, Vogel SN. Space and time: New considerations about the relationship between Toll-like receptors (TLRs) and type I interferons (IFNs). *Cytokine* 2015;74:171-4;
75. Pruett SB, Fan R. Ethanol inhibits LPS-induced signaling and modulates cytokine production in peritoneal macrophages in vivo in a model for binge drinking. *BMC immunology* 2009;10:49.
76. Shukla SD, Pruett SB, Szabo G, Arteel GE. Binge ethanol and liver: new molecular developments. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2013;37:550-7.
77. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30:8285-95.
78. Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF-alpha regulation. *Journal of leukocyte biology* 2008;84:1335-45.
79. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2001 Jul;34:101-8.
80. Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2007;72:408-15.
81. Petrasek J, Mandrekar P, Szabo G. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Gastroenterology Research and Practice* July 2010;<http://dx.doi.org/10.1155/2010/710381>.
82. Francés R, Muñoz C, Zapater P, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut*. 2004; 53:860-4.
83. B Massonnet, A Delwail, J-M Ayrault, C Chagneau-Derrode, J-C Lecron, Silvain C. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation. *Clin Exp Immunol*. 2009; 58:115-24.
84. Gustot T LA, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C,. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006 ;43:989-1000.
85. Crews FT, Sarkar DK, Qin L, Zou J, Boyadjieva N, Vetreno RP. Neuroimmune Function and the Consequences of Alcohol Exposure. *Alcohol Res* 2015;37:331-51.

86. Pascual M, Baliño P, Aragón CM, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*. 2015; 89:352-9.

87. Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, J. Z. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 2013;1;73:602-12.

88. Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*. 2012; 9:130.

89. Alfonso-Loeches S, Pascual M, Guerri C. Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology*. 2013;6;311:27-34.

90. Vetreno RP, Crews FT. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2012; 226:475-88.

91. Pascual M, Pla A, Minarro J, Guerri C. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 2014;49:187-92.

92. Vetreno RP, Crews FT. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:35.

93. Montesinos J, Pascual M, Rodriguez-AriasM, Miñarro J, Guerri C. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain Behav Immun*. 2016;53:159-71.

94. Pang M, Bala S, Kodys K, Catalano D, Szabo G. Inhibition of TLR8- and TLR4-induced Type I IFN induction by alcohol is different from its effects on inflammatory cytokine production in monocytes. *BMC immunology*. 2011;12:55.

95. Pruett SB, Schwab C, Zheng Q, Fan R. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004;173:2715-24.

96. Dolganiuc A, Bakis G, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006;30:76-85.

97. Jong WJ, Cleveringa AM, Greijdanus B, Meyer P, Heineman E, Hulscher JB. The effect of acute alcohol intoxication on gut wall integrity in healthy male volunteers; a randomized controlled trial. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2015;49:65-70.
98. Pruett SB, Fan R, Zheng Q, Schwab C. Differences in IL-10 and IL-12 production patterns and differences in the effects of acute ethanol treatment on macrophages in vivo and in vitro. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 2005;37:1-8.
99. Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide. Applied Biosystems, 2010. (Consultado el 10-4-2016). Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_046739.pdf.
100. Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Clinical Applications of PCR: Springer*; 2006:19-32.
101. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000;29:332-7
102. Torres Triana J.L. Expresión de PPAR- γ y miR-27 en el tejido adiposo de pacientes obesos (tesis doctoral). Salamanca. Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina; Universidad de Salamanca. 2015.
103. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;18;3.
104. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-50
105. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol* 2004;26:509-15.
106. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (CT)) Method *Methods.* 2001;25:402-8
107. Barnett V, Lewis T. *Outliers in statistical data.* 3rd edition. Wiley and Sons Biometrical Journal 1995;37:256.
108. Molina Arias M, Ochoa Sangrador C. Estudios observacionales (III). Estudios de casos y controles. *Evid Pediatr.* 2014; 10:33.

109. Lazcano Ponce E, Salazar Martínez E, Hernández Ávila M. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública* 2001;43:135-50.
110. López-Moreno JA, Marcos M, Calleja-Conde J, et al. Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 39:1939-50.
111. Cummings P, Weiss S N. Cases series and exposure series: the role of studies without in providing information about the etiology of injury of disease. *Injury Prevention*. 1998;4:54-7.
112. Gil P. *Medicina Prventiva y Salud Pública 10ª Edición*. Editorial Masson. 2002.
113. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;1;22:1668-73.
114. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:46-57.
115. Haiyan Chen MJC, Jeffrey D. Hasday, Stefanie N. Vogel and Andrei E. Medvedev. Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1R-Associated Kinase, p38, and NF- κB in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007;179:6097-6106;.
116. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004;15:155-66.
117. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1:1559-82.
118. Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García MJ, de la Rosa A, Vargas M, Marrero F. Ritmo luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:555-60.
119. Biancotto A, Wank A, Perl S, et al. Baseline Levels and Temporal Stability of 27 Multiplexed Serum Cytokine Concentrations in Healthy Subjects. *PloS one*. 2013;12;8:76091.
120. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*. 2002;309:293-300.

121. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004;59:566-73.
122. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes* 2014;7:129.
123. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;18:3.
124. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26:509-15.
125. Macías R, Torres JL, Manzanedo L, et al. Validación de genes de referencia endógenos para qRT-PCR en muestras humanas de tejido adiposo visceral y periférico para estudio en pacientes con obesidad. *Revista Clínica Española.* 2014;214:1310.
126. Rohini Mehta AB, Noreen Hossain, Arian Afendy, Vikas Chandhoke, Zobair Younossi, et al. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol.* 2010; 21; 11:39.
127. Boujedidi H, Bouchet-Delbos L, Cassard-Doulicier AM, et al. Housekeeping gene variability in the liver of alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2012 36:258-66
128. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002;30:503-12.
129. Hilscher C, Vahrson W, Dittmer DP. Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic acids research.* 2005;33:182.
130. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry.* 2009;55:611-22.
131. Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 2009 50:1258-66.
132. Zemánková K, Makoveichuk E, Vlasáková Z, Olivecrona G, Kovář J. Acute alcohol consumption downregulates lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism.* 2015; 64:1592-6.

133. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002;15;168:554-61.
134. Klawitter M, Hakoziaki M, Kobayashi H, et al. Expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells. *Eur Spine J.* 2014; 23:1878-91.
135. Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro *Inmunología.* 2006;25:115-30.
136. Mäkelä SM, Strengell M, Pietilä TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *Journal of leukocyte biology.* 2009;85:664-72.
137. Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R Jr, Gonçalves N, et al. Attenuation of toll-like receptor 2-mediated innate immune response in patients with alcoholic chronic liver disease. *Liver Int.* 2010; 30:1003-11.
138. Hritz I, Mandrekar P, and Mandrekar P, The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology,* 2008. 48:1224–1231.
139. Bailey KL, Wyatt TA, Romberger DJ, Sisson JH. Alcohol functionally upregulates Toll-like receptor 2 in airway epithelial cells. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2009;33:499-504.
140. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential role of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:4443-51.
141. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *Immunol.* 1999;163:1-5.
142. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood.* 2002; 1;99:3427-31.
143. Vetreno RP, Qin L, Crews FT. Increased receptor for advanced glycation end product expression in the human alcoholic prefrontal cortex is linked to adolescent drinking. *Neurobiology of disease.* 2013;59:52-62.

144. Montesinos J, Pascual M, Pla A, et al. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun.* 2015; 45:233-44.
145. Montesinos J, Pascual M, Rodriguez-Arias M, Guerri C. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain Behav Immun.* 2016;53:159-71.
146. Varlinskaya EI, Spear LP. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2002 26:1502-11.
147. American Academy of Pediatrics. Alcohol Use by Youth and Adolescents: A Pediatric Concern. 2010. *Pediatrics.* 125:1078-1087.
148. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2010;30:8285-95.
149. Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci.* 2007; 25:541-50.
150. Spear LP. Adolescents and Alcohol: Acute Sensitivities, Enhanced Intake, and Later Consequences. *Neurotoxicol Teratol.* 2013;41:51-9.
151. Ashley MJ, Olin JS, le Riche WH, Kornaczewski A, Schmidt W, JG. R. Morbidity in alcoholics. Evidence for accelerated development of physical disease in women. *Arch Intern Med.* 1977;137:883-7.
152. Krasner N, Davis M, Portmann B, Williams R. Changing pattern of alcoholic liver disease in Great Britain: relation to sex and signs of autoimmunity. *Br Med J.* 1977 1:1497-500.
153. Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *The New England journal of medicine* 1990 11:95-9.
154. Engler H, Benson S, Wegner A, Spreitzer I, Schedlowski M, Elsenbruch S. Men and women differ in inflammatory and neuroendocrine responses to endotoxin but not in the severity of sickness symptoms. *Brain Behav Immun* 2016; 52:18-26.
155. Pascual M, Montesinos J, Marcos M, et al. Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge drinking in adolescence. Enviado pendiente de revisión.

156. Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Influence of adolescent heavy session drinking on the systemic and brain innate immune system. *Alcohol Alcohol*. 2014; 49:193-7.
157. Pascual M, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C. Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptive immune responses in peritoneal macrophages. *Immunology and cell biology*. 2011;89:716-27.
158. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Molecular immunology*. 2008;45:2007-16.
159. Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor- α (TNF- α) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem*. 2011;14;286:1436-44.
160. von Maltzan K, Tan W, Pruett SB. Investigation of the role of TNF- α converting enzyme (TACE) in the inhibition of cell surface and soluble TNF- α production by acute ethanol exposure. *PLoS one*. 2012;7:29890.
161. Zhao XJ, Marrero L, Song K, et al. Acute alcohol inhibits TNF- α processing in human monocytes by inhibiting TNF/TNF- α -converting enzyme interactions in the cell membrane. *J Immunol*. 2003;15;170:2923-31.

