UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

CATEDRA DE CIRUGIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA
1571012

"MONITORIZACION DE LA FUNCION HEPATICA MEDIANTE EL ANALISIS CITOLOGICO Y BIOQUIMICO DE LA BILIS EN EL PACIENTE CON TRASPLANTE ORTOTOPICO DE HIGADO"

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

POR:

LUIS CARRASCO GONZALEZ

UNIVERSIDAD DE MURCIA DOCTORADO COMISION GENERAL
23 DIC. 1994

UNIVERSIDAD DE MURCIA

El Prof. Dr. Pascual Parrilla Paricio, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de Murcia y el Prof. Dr. Francisco Sánchez Bueno, Profesor Titular de Cirugía de la Facultad de Medicina de Murcia,

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral que presenta D. Luis Carrasco González, titulada **"Monitorización de la función hepática mediante el análisis citológico y bioquímico de la bilis en el paciente con trasplante ortotópico de hígado"**, ha sido realizada bajo su dirección.

Fdo: Prof. Pascual Parrilla Paricio

Fdo: Prof. Francisco Sánchez Bueno

23 DIC. 1994

UNIVERSIDAD DE MURCIA — DOCTORADO — COMISIÓN BEREIL

Murcia, Diciembre 1994

UNIVERSIDAD DE MURCIA

"Un hombre no llegaría a hacer nada, si esperase hasta poderlo hacer tan bien, que nadie pudiera encontrarle la menor falta"

Cardenal Newman

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

A Ana
A mis padres

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Pascual Parrilla, quiero manifestarle mi mayor agradecimiento por un doble motivo: ser el maestro de muchos y ejemplo para todos, y darme la oportunidad de poder desarrollar cualquier trabajo, apoyándome con sus ideas y empuje.

Al Profesor Francisco Sánchez Bueno, a quien debo en gran parte la realización de esta tesis. Gracias por tu interés y ayuda.

Al Profesor José María Ruíz Gómez, que ha llevado el peso de todo el trabajo estadístico, estando, en todo momento, dispuesto a prestarme su tiempo.

Al Doctor Joaquín Sola, por su imprescindible colaboración en el análisis celular de la bilis. Una vez más, su experiencia ha sido fundamental.

Al Doctor Millán Pérez Ayala, por su ardua tarea en el análisis bioquímico biliar.

Al Doctor Pablo Ramírez, que confió desde el principio en este trabajo.

A mi amigo Benito Flores por su generosa y desinteresada ayuda.

A mis amigos Bruno de Andrés, Rogelio Calderón, Pepe Aguilar, Juanma Pérez Abad Víctor Soria, Tere Soria y José Manuel Rodríguez, porque siempre he podido contar con ellos.

A todos los componentes del Servicio de Cirugía (Residentes, Adjuntos y Secretarias), porque gracias a su dinamismo, el que quiere puede trabajar. De todos ellos he aprendido algo.

A Tere Manzanera y Fuensanta Caro por su inestimable ayuda en el laboratorio de Citología.

A Ana, mi mujer, que ha estado a mi lado en los momentos de desaliento.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

INDICE

I.-INTRODUCCION 1

A) ANALISIS DE OBJETIVOS 1

B) REVISION DE CONOCIMIENTOS 3

PARTE PRIMERA: Trasplante hepático: Perspectiva histórica.Indicaciones y contraindicaciones. Complicaciones.

1-Perspectiva histórica.

2.-Indicaciones y contraindicaciones del trasplante ortotópico de hígado.

2.1.-Indicaciones.

2.2.-Contraindicaciones.

3.-Complicaciones del trasplante ortotópico de hígado.

3.1.-Complicaciones relacionadas directamente con la intervención quirúrgica y el funcionamiento inicial del injerto

3.2.-Rechazo.

3.3.-Complicaciones infecciosas.

3.4.-Recidivas de la enfermedad.

PARTE SEGUNDA: Bioquímica biliar. Puesta al dia.

1.-Anatomía hepatobiliar y formación de bilis.

2.-Histología del sistema biliar.

2.1.-Red biliar canalicular.

2.2.-Uniones canalículoductulares.

2.3.-Conductillos biliares.

2.4.-Conductos biliares.

3.-Fisiología del aparato biliar.

3.1.-Composición de la bilis hepática.

3.2.-Factores que influyen en la composición de la bilis.

3.3.-Mecanismos de formación de la bilis hepática.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

4.-Los lípidos biliares en el paciente portador de tubo en "T" de Kehr.

5.-Valor diagnóstico del estudio bioquímico de la bilis en pacientes con trasplante ortotópico de hígado.

5.1.-Problemática de la monitorización de la función del hígado trasplantado.

5.2.-Composición de la bilis del hígado trasplantado. Lípidos biliares.

5.3.-Efectos de la ciclosporina en la secreción biliar.

5.4.-Efectos de la denervación del hígado en la secreción biliar.

PARTE TERCERA: Papel diagnostico de la citologia biliar.

1.-Antecedentes históricos.

2.-Técnicas generales citológicas.

2.1.-Citología simple o exfoliativa.

2.2.-Citología de lavado.

2.3.-Citología de cepillado.

2.4.-Biopsia-citología por aspiración (BCA) o Punción-aspiración con aguja fina (PAAF).

3.-Citología exfoliativa de los conductos biliares. Patrón biliar normal. Efectos de la inflamación.

3.1.-Citología de la bilis normal.

3.2.-Citología biliar en la coledocolitiasis. Efectos de la inflamación.

4.-La citología biliar exfoliativa en el diagnóstico de las complicaciones del paciente con trasplante ortotópico de hígado.

4.1.-Citología y trasplante. Antecedentes y actualidad.

4.2.-Otros patrones citológicos.

5.-Biopsia hepática en el trasplante ortotópico de hígado. Bases histopatológicas de las complicaciones.

5.1.-Histopatología del rechazo.

5.2.-Histopatología de otras complicaciones.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

II.-MATERIAL Y METODO 56

MATERIAL

1.-Pacientes.

2.-Material para el estudio de la bioquímica biliar (lípidos biliares).

3.-Material para el estudio de la citología biliar.

4.-Aparatos de medida.

METODO

1.-Desarrollo de las experiencias.

2.-Descripción técnica de la determinación de los parámetros.

3.-Método estadístico.

III.-RESULTADOS 73

1.-Estudio descriptivo.

1.1.-Grupo Control.

1.2.-Grupo Trasplante.

2.-Estudio comparativo.

2.1.-Parámetros Citológicos.

2.2.-Flujo biliar y parámetros Bioquímicos.

IV.-DISCUSION Y COMENTARIOS 90

I.-Sobre la citología biliar simple o exfoliativa.

1.-Comentarios sobre el método.

2.-Citología biliar simple o exfoliativa en pacientes con coledocolitiasis.

3.-La citología biliar simple o exfolilativa en los pacientes trasplantados.

II.-Sobre el flujo y los lípidos biliares en la monitorización de la función hepática.

1.-Comentarios sobre el método y el grupo control.

2.-Pacientes con trasplante ortotópico de hígado. Papel del flujo y los lípidos biliares en la monitorización del injerto.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

V.-CONCLUSIONES 105

A) Respecto a la citología biliar.

B) Respecto al flujo y a la composición lipídica biliar.

VI.-BIBLIOGRAFIA 107

VII.-TABLAS Y FIGURAS. 130

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

I.-INTRODUCCION

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

A) Análisis de Objetivos

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

El paciente con un trasplante ortotópico de hígado (TOH) está sujeto a la aparición de múltiples complicaciones, desde el momento de la intervención. Las complicaciones se consideran precoces si se manifiestan en los primeros días del postoperatorio, siendo las más frecuentes la disfunción primaria del injerto, la disfunción secundaria a isquemia por trombosis arterial o portal y el rechazo hiperagudo.

Posteriormente, durante el primer mes postoperatorio, es frecuente la aparición de episodios de rechazo agudo y de infecciones de diversa índole: colangitis, sepsis, bronconeumonía, etc... En este periodo, es fundamental el diagnóstico precoz de las complicaciones, para su correcto tratamiento, evitando el deterioro irreversible del injerto y, en ocasiones, la muerte del paciente.

El diagnóstico, sobre todo del rechazo, se realiza, habitualmente, mediante datos clínicos (fiebre, ictericia,...), test séricos de función hepática (elevación de los niveles séricos de transaminasas hepáticas, bilirrubina, gammaglutamiltranspeptidasa y fosfatasa alcalina), y se confirma por los signos histológicos específicos en los espécimenes de tejido hepático. No obstante, la obtención del espécimen hepático precisa la realización de una biopsia, método invasivo, no exento de una alta tasa de morbilidad e incluso, en caso de deterioro clínico severo del paciente, puede estar contraindicada.

Se han buscado métodos diagnósticos alternativos a la biopsia que sean incruentos, que puedan realizarse, de forma rutinaria, a cualquier enfermo trasplantado, independientemente de sus condiciones generales. En este sentido se han iniciado dos lineas de investigación: por un lado, estudios destinados a conocer el flujo y la secreción lipídica biliar diaria, que se produce en un hígado trasplantado, con el fin de monitorizar la función hepática, ya que tanto el flujo como las concentraciones de los lípidos biliares constituyen fieles marcadores de la función hepática. Por otro lado, estudios citológicos, que evalúan diariamente la densidad y composición celular de la bilis, con el fin de diagnosticar precozmente, basándose en las alteraciones de dichos parámetros, los diferentes procesos patológicos (fundamentalmente el rechazo, la sepsis y el fallo primario del injerto) que puedan acontecer en el hígado trasplantado.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Estas dos líneas de investigación tienen gran interés, pues, de confirmarse los resultados preliminares obtenidos por diversos investigadores, podemos encontrarnos ante unos métodos diagnósticos con enorme aplicabilidad clínica.

En este sentido, hemos pretendido profundizar en el estudio del flujo y la secreción lipídica biliar, así como en el de la citología simple de la bilis de los pacientes intervenidos por coledocolitiasis (constituyendo el grupo control), comparando los resultados con los obtenidos en los pacientes con trasplante ortotópico de hígado. Nuestros objetivos han sido:

1º) Estudiar la densidad celular (nº de células por extensión), así como la composición celular (porcentaje de los distintos tipos de células) de la bilis de pacientes intervenidos por coledocolitiasis y pacientes con trasplante ortotópico de hígado para obtener sus patrones citológicos. Así mismo, hemos pretendido evaluar la eficacia del análisis citológico biliar para el diagnóstico de las alteraciones del hígado trasplantado, fundamentalmente el rechazo, la sepsis, y el fallo primario del injerto, basándonos en la variación de dichos patrones durante las mismas.

2º) Estudiar el flujo biliar (volumen diario de bilis) y la concentración de los lípidos biliares en pacientes intervenidos por coledocolitiasis (grupo control) y en pacientes con trasplante ortotópico de hígado, para evidenciar el efecto de la intervención y el de las diversas complicaciones del injerto (rechazo, sepsis y fallo primario) sobre dichos parámetros, valorando la eficacia de la medida de los mismos en el diagnóstico de las complicaciones.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

B) Revisión Bibliográfica

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

PARTE PRIMERA

TRASPLANTE HEPATICO: PERSPECTIVA HISTORICA. INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES. COMPLICACIONES

1.-PERSPECTIVA HISTORICA

Los primeros estudios experimentales sobre trasplantes fueron realizados, en 1902, por CARREL et al. y, en 1912, por GUTRIE, para perfeccionar la técnica quirúrgica de las anastomosis vasculares. El primer trasplante de hígado, experimental, lo realizaron WELCH et al.(1), en 1955, utilizando un perro como animal de investigación y colocando el injerto en situación heterotópica. Observaron que el hígado trasplantado producía bilis durante varios días después del trasplante, pero más tarde, dejaba de funcionar. El estudio histológico del mismo demostraba la existencia de rechazo, hecho previsible, dado que no se administraba tratamiento inmunosupresor. Más tarde, en 1956, CANNON (2) lleva a cabo el primer trasplante ortotópico experimental de hígado. Los animales (de especie no especificada) no sobrevivieron, y la publicación era tan breve que carecía de título y de descripción del método. Finalmente, en 1959, MOORE y STARZL (3,4) comunican por separado, la realización de trasplantes ortotópicos de hígado en perros con supervivencia prolongada. Se delimitaron los problemas técnicos de la sustitución hepática y las características del rechazo en perros receptores no tratados.

El primer trasplante ortotópico de hígado (TOH) en humanos, fue efectuado por STARZL en 1963 (Denver, USA). Se trataba de un niño de tres años con una atresia de vías biliares, que falleció pocas horas después de la intervención por hemorragia. Sucesivos intentos ulteriores fracasaron, hasta que en 1967, el mismo STARZL, consigue una supervivencia de trece meses en una niña de ocho años y medio con un hepatoma (5, 7). En Europa, CALNE realiza el primer TOH en 1968 (Cambridge, G.B.), con una supervivencia de once semanas (6). Los resultados obtenidos durante aquellos primeros años fueron poco alentadores, ya que obtenían una supervivencia inferior al 30% al año, por lo que solamente los equipos de CALNE y STARZL continuaron realizando este tipo de cirugía (7).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

El descubrimiento de la ciclosporina, en 1976 por BOREL, marcó un hito en el panorama de los trasplantes de órganos (8). Esta sustancia tiene efectos inmunosupresores potentes y muy selectivos contra linfocitos T, sin depresión de la médula ósea, permitiendo un mayor control del rechazo y mejorando considerablemente la supervivencia de los pacientes trasplantados. En 1979, CALNE consigue su utilización clínica y, posteriormente, STARZL la asoció a los corticoides, mejorando de forma espectacular los resultados clínicos. Todo ello permitió obtener, en la década de los ochenta, una supervivencia al año próxima al 70% (9,10). El espaldarazo definitivo al TOH vendrá de la mano del Consensus Developement Conference (National Institutes of Health, U.S.A.) que, en 1983, establece al trasplante hepático como una modalidad terapéutica aceptable para el tratamiento de hepatopatías crónicas en estadío terminal (11).

En España, el primer trasplante hepático se realizó en Febrero de 1984, en el Hospital de Bellvitge (Barcelona), por el equipo de los doctores JAURRIETA y MARGARIT (12). Desde ese momento, el trasplante hepático se desarrolla en nuestro país de forma extraordinaria, ocupando el tercer puesto mundial en número de trasplantes por millón de habitantes, tras Estados Unidos y Francia. Así, en 1992 se efectuaron en España más de cuatrocientos trasplantes de hígado.

El éxito alcanzado por este tipo de cirugía se debe a la consecución de los siguientes hitos:

1.-Mejor conocimiento de la fisiopatología del hígado enfermo.

2.-Adecuada selección del paciente y del momento de la intervención.

3.-Estandarización de la técnica quirúrgica.

4.-Mejora en la selección y mantenimiento del donante de órganos y en la utilización de nuevas soluciones de preservación (solución de Euro Collins y, sobre todo, solución de Wisconsin).

5.-Importantes avances en el cuidado perioperatorio del enfermo trasplantado.

6.-Notable desarrollo de procedimientos de soporte vital, tales como el bypass venovenoso o el sistema de infusión rápida de fluidos, durante el acto operatorio.

7.-Mejores protocolos de inmunosupresión, en especial la utilización de ciclosporina y OKT3.

8.-Diagnóstico y tratamiento precoz de las complicaciones postoperatorias.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Este último punto es fundamental para la correcta evolución del paciente realizándose, actualmente, grandes esfuerzos por mejorarlo. Así, se investigan nuevos métodos diagnósticos que detecten las alteraciones del injerto lo más precozmente posible, que sean fácilmente aplicables y con un alto índice de sensibilidad y especificidad, pues de su éxito dependerá, en gran medida, el resultado final de la intervención y por ende, el pronóstico del paciente.

En este sentido, diversos grupos de investigadores, a finales de los ochenta, iniciaron estudios de citología biliar en pacientes trasplantados, y otros, comenzaron a estudiar la composición bioquímica de la bilis de estos pacientes, con la finalidad de detectar las alteraciones que aparecen en las diversas situaciones fisiopatológicas del hígado trasplantado, habiéndose obtenido con los resultados preliminares unas esperanzadoras conclusiones (13, 14).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

2.-INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES DEL TOH

2.1.-Indicaciones

Inicialmente, el TOH se realizaba en pacientes con cirrosis en estadío terminal y en tumores malignos primarios del hígado, considerados quirúrgicamente irresecables (5, 7).

Con el desarrollo de la técnica quirúrgica y del control postoperatorio del paciente, se fueron ampliando las indicaciones. En la actualidad, podemos decir que es susceptible de trasplante hepático todo aquel paciente con una enfermedad hepática crónica en fase terminal, con una supervivencia inferior a un año, los pacientes que tienen una insuficiencia hepática aguda fulminante y los que precisen retrasplante. Aunque las indicaciones y las contraindicaciones varían en los diversos grupos, de acuerdo con su experiencia y resultados obtenidos (15-18), vamos a definir someramente las hepatopatías que son objeto de trasplante hepático:

2.1.1.-INSUFICIENCIA HEPATICA CRONICA

A) Hepatopatías de predominio colostático

-Cirrosis biliar primaria

-Colangitis esclerosante primaria

-Atresia de vías biliares

-Enfermedad de Alagille

-Enfermedad de Caroli

-Colostasis idiopática

B) Hepatopatías de predominio hepatocelular

-Cirrosis criptogenética

-Cirrosis posthepatítica

-Cirrosis alcohólica

UNIVERSIDAD DE MURCIA

C) Trastornos congénitos o metabólicos

-Enfermedad de Wilson

-Hemocromatosis

-Porfiria cutánea tarda

-Déficit de alfa-1-anti-tripsina

-Tirosinemia

-Glucogenosis

-Amiloidosis.

D) Hepatopatías de etiología vascular

-Síndrome de Budd-Chiari.

2.1.2.-TUMORES HEPATICOS

-Hepatocarcinoma

-Colangiocarcinoma

-Adenoma hepático

2.1.3. -INSUFICIENCIA HEPATICA AGUDA

-Hepatitis vírica

-Hepatitis tóxicomedicamentosa

2.1.4.-RETRASPLANTE

2.2.-Contraindicaciones

2.2.1.-ABSOLUTAS

-Incapacidad para entender, aceptar y colaborar en el trasplante

-Sepsis activa de origen extrahepatobiliar

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-Cáncer irresecable de origen extrahepatobiliar

-Enfermedad cardiopulmonar grave

-Adicción activa a drogas

-SIDA

2.2.2.-RELATIVAS

-Edad superior a sesenta años

-Sepsis activa de origen hepatobiliar

-Infección activa de órganos extrahepatobiliares

-Infección activa por virus de la hepatitis B

-Colangiocarcinoma

-Ulcera péptica activa

-Diabetes Mellitus insulinodependiente

-Insuficiencia renal crónica grave

-Profunda desnutrición

-Trombosis de la vena porta

-Anastomosis porto cava previa

-Cirugía hepatobiliar mayor previa

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

3.-COMPLICACIONES DEL TRASPLANTE ORTOTOPICO DE HIGADO

Las complicaciones específicas del TOH se pueden dividir en cuatro grandes grupos:

1.-Aquellas relacionadas directamente con la intervención quirúrgica y con el funcionamiento inicial del injerto.

2.-Rechazo (hiperagudo, agudo y crónico).

3.-Infecciones.

4.-Recidivas de la enfermedad.

3.1.-Complicaciones relacionadas directamente con la intervención quirúrgica y el funcionamiento inicial del injerto

3.1.1.-HEMORRAGIA INCOERCIBLE.

Puede aparecer en el acto operatorio aunque, generalmente, se presenta en el postoperatorio inmediato, y es una de las complicaciones más temidas. En su génesis participan diversos mecanismos tales como el déficit de los factores de coagulación, plaquetopenia, hipertensión portal, manipulación quirúrgica y la fibrinolisis que aparece en la fase de desclampaje (19). La mejor reposición de plaquetas y factores de coagulación, así como una cuidadosa técnica quirúrgica, ha disminuido la mortalidad de esta complicación.

3.1.2.-DISFUNCION O FALLO PRIMARIO DEL INJERTO.

Es una complicación de causa no conocida, aunque se ha asociado a la isquemia del hígado del donante, durante el proceso de la extracción quirúrgica, y/o preservación del mismo, o a lesiones no isquémicas previas no detectadas (por ejemplo una severa esteatosis microvesicular). Es la principal causa de pérdida del órgano y de mortalidad en el postoperatorio inmediato. Su incidencia varía entre 4-10% (20). Clínicamente se manifiesta, desde el primer día postoperatorio, con una muy escasa o nula producción de bilis, con poca viscosidad y filancia, con muy bajas concentraciones de lípidos, pigmentos biliares y bilirrubina; en plasma, los enzimas hepáticos permanecen elevados y la actividad de protrombina muy baja

UNIVERSIDAD DE MURCIA

(14). Signos clínicos más tardíos son la ictericia, el fallo renal, la alteración de conciencia y la necesidad de ventilación mecánica. Los hallazgos histológicos son variables, pudiendo encontrar una gran necrosis isquémica, frecuentemente localizada en las zonas subcapsulares, con preservación de la arquitectura hepática restante. En ocasiones no se observan alteraciones histológicas (21, 22).

Un aspecto fundamental en esta complicación es el diagnóstico precoz. Así, se han estudiado marcadores bioquímicos para valorar la función hepática después del trasplante, habiéndose obtenido esperanzadores resultados con la prueba de función hepática, basada en el estudio del metabolismo de la lidocaína o con la determinación de cuerpos cetónicos en sangre arterial (21). Cuando la situación es irreversible, el único tratamiento es el retrasplante, aunque algunos autores consideran que hay disfunciones primarias leves y/o moderadas que mejoran con la administración i.v. de prostaglandinas (21, 22, 23).

3.1.3.-TROMBOSIS VASCULAR.

El restablecimiento de un flujo arterial óptimo, tras la realización del TOH, es un paso obligado para asegurar la viabilidad del injerto. Por ello, la aparición de complicaciones derivadas de la fase de arterialización provoca lesiones isquémico-necróticas hepáticas que, rápidamente, se colonizan por gérmenes gram-negativos, conduciendo a un estado de sepsis y fallecimiento del enfermo si no se realiza un retrasplante con carácter de extrema urgencia (22). La **trombosis arterial** es una complicación frecuente en adultos (5-10%), y más en los niños, pudiendo llegar a constituir el 30% de las causas de fallo del injerto, siendo más frecuente cuanto más pequeño es el receptor (24). La etiología es muy variada, habiéndose relacionado con el daño mecánico e isquémico que sufre la íntima arterial en las distintas fases de la intervención. Otras veces está imbricada la diferencia de calibre entre la arteria del donante y del receptor, o bien hay redundancia de la arteria hepática, suturas estenosantes, alteraciones hemodinámicas severas, etc... (22, 25).

La forma clínica de presentación varía dependiendo del tiempo de oclusión del flujo arterial hepático y de la circulación de suplencia creada. Aproximadamente un 50% de los pacientes desarrollan una necrosis hepática fulminante, en el primer mes postrasplante, o una fístula biliar tardía. No obstante, la presentación clínica más característica es la de bacteriemia

UNIVERSIDAD DE MURCIA

recidivante sin aparente focalidad, asociadas en ocasiones a una ligera disfunción analítica del injerto, con disminución en la producción de bilis (con caída en la concentración de lípidos biliares y elevación de la celularidad) (13, 14, 20, 22, 26).

La Eco-doppler constituye el método diagnóstico más rápido y útil, reservando los estudios angiológicos selectivos para los casos dudosos (21, 22).

El tratamiento de elección es el retrasplante urgente pues la trombectomía con reconstrucción arterial solo es eficaz cuando las lesiones del injerto sean reversibles, hecho excepcional (26).

La **trombosis portal** es menos frecuente y se suele asociar a derivaciones portosistémicas previas (27). Errores técnicos como la redundancia venosa, estenosis, y/o torsión anastomótica son factores decisivos para el desarrollo de una trombosis portal (28).

La oclusión portal precoz suele manifestarse de forma variada pero siempre grave. La hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas, el fallo hepático, ascitis masiva y edema intestinal son manifestaciones clínicas descritas en estos pacientes (22, 28). La trombosis portal tardía o crónica es un cuadro más solapado y se suele caracterizar por la presencia de varices esofágicas y una ligera disfunción analítica hepática.

El diagnóstico de trombosis portal es sugerido por estudios ecográficos con Doppler y confirmado por la fase venosa de una arteriografía selectiva de arteria mesentérica superior, venografía portal transhepática o esplenoportografía (21).

El tratamiento de esta entidad suele ser el retrasplante (22, 28), aunque se han descrito algunos casos en los que la trombectomía precoz ha tenido éxito.

Mucho menos frecuente es la **trombosis de la vena cava**. Las especiales características de esta estructura venosa facilitan la realización de la anastomosis, alejando el posible error técnico. La desproporción entre el tamaño del órgano donante y la fosa hepática receptora es el principal factor favorecedor de esta complicación. Clínicamente se manifiesta como un síndrome de Budd-Chiari agudo y/o síndrome oclusivo de vena cava inferior. Se han descrito diversas alternativas terapéuticas para esta complicación, tales como la reconstrucción quirúrgica inmediata, la angioplastia percutánea trasluminal, la trombolisis local, e incluso el retrasplante urgente (22, 28, 29).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

3.1.4.-DEHISCENCIAS Y ESTENOSIS DE LA VIA BILIAR.

Inicialmente, las complicaciones derivadas de la reconstrucción biliar constituían una fuente importante de morbimortalidad postoperatoria. De los diversos procedimientos descritos para la reconstrucción de la vía biliar en el TOH, los más aceptados son la colédoco-coledocostomía término-terminal tutorizada sobre tubo en "T", por ser más fisiológica, y la hepático-yeyunostomía en "Y" de ROUX para pacientes con anomalías anatómicas o patología en la vía biliar (30, 31, 32). La **fístula biliar** productora de pequeñas colecciones subhepáticas o de peritonitis difusas es la complicación más frecuentemente encontrada (32, 33). Tras su diagnóstico, el tratamiento quirúrgico inmediato, el drenaje radiológico dirigido por ecografía o la actitud conservadora dependerá de la repercusión clínica que provoque, de su débito y del grado de afectación de la anastomosis confirmado radiológicamente (30, 31, 32, 33).

La **estenosis de la vía biliar** por causas intrínsecas es una complicación poco frecuente. En su diagnóstico y tratamiento, la radiología intervencionista juega, hoy día, un papel crucial. La dilatación y posterior colocación de tutores transanastomóticos permite resolver en muchos casos esta complicación (30, 31).

Otra complicación que puede aparecer es la obstrucción biliar provocada por el **desarrollo precoz de barro biliar intraductal**, relacionado con lesiones isquémicas del epitelio biliar y con estenosis de la anastomosis (34). La extracción del mismo por técnicas endoscópicas evita, en muchas ocasiones, la intervención quirùrgica sobre la vía biliar (30, 31).

La **disfunción del drenaje biliar** por malposición, la movilización del mismo, su extracción accidental e incluso la fístula biliar aparecida ocasionalmente tras su retirada rutinaria, constituyen otro grupo de complicaciones que pueden aparecer en estos pacientes, si bien las mejoras técnicas y la utilización de drenajes de látex han permitido disminuir considerablemente su incidencia (30, 31).

3.2.-Rechazo

El rechazo es un fenómeno biológico desencadenado por el sistema inmunológico del individuo receptor de un trasplante, que reconoce como extrañas las células del órgano

UNIVERSIDAD DE MURCIA

trasplantado, e induce la infiltración del injerto por células inflamatorias que desencadenarán, si no se controla, la destrucción de dicho órgano. Este fenómeno se caracteriza por ser específico y con memoria, es decir que enfrentado el receptor a otro injerto del donante, se producirá una reacción inflamatoria contra el injerto mucho mayor y más acelerada.

A principios de este siglo, con la realización de los primeros trasplantes experimentales, se observó que a los pocos días de la intervención el animal fallecía y, el examen necrópsico evidenciaba en el órgano trasplantado un gran proceso inflamatorio con necrosis extensa del mismo. Las observaciones de MEDAWAR (35) en los trasplantes de piel en pacientes quemados durante la segunda guerra mundial, junto con las experiencias previas de trasplante de piel en ratas, sentaron las bases científicas del rechazo de los injertos. Estos trabajos describían la infiltración del injerto por linfocitos del receptor que conducía a la destrucción del mismo. Posteriormente, WELCH (1) evidenció dicho fenómeno en los injertos hepáticos en perros.

El fracaso de los trasplantes renales, excepto entre gemelos univitelinos, indicaba que el rechazo tenía una base genética. Más tarde, DAUSSET describió los antígenos de histocompatibilidad (HLA) en los leucocitos y después se reconocieron en todas las células del organismo. Se trata de unas glicoproteínas, cuya síntesis está codificada en el brazo corto del cromosoma 6, situadas en la membrana celular y su composición es específica de cada individuo. Por ello, el sistema inmune del receptor reconoce como extrañas las glicoproteínas del HLA del injerto, activándose y desencadenando la reacción de rechazo.

Los primeros éxitos en el trasplante hepático se consiguieron al dominar el problema del rechazo mediante tratamiento inmunosupresor, inicialmente constituido por corticoides y azatioprina, junto a una selección de candidatos con la máxima compatibilidad en el grupo sanguíneo. La introducción en la década de los ochenta de una nueva generación de inmunosupresores como la ciclosporina y, posteriormente la OKT3, mucho más potentes y selectivas, aportó un cambio radical en el control del rechazo y por tanto en la supervivencia del paciente trasplantado.

Según la cronología de presentación y el mecanismo inmunológico predominante se distinguen fundamentalmente tres tipos de rechazo:

-Rechazo hiperagudo

-Rechazo agudo

UNIVERSIDAD DE MURCIA
DOCTORADO
COMISION GENERAL
UNIVERSIDAD DE MURCIA

-Rechazo crónico

3.2.1.-RECHAZO HIPERAGUDO.

Es una complicación muy rara, habiéndose observado en pacientes con grupo ABO incompatible, y conlleva un fallo precoz del injerto (36, 37). Aparece horas después del trasplante y está mediado por un mecanismo inmunológico humoral (anticuerpos citotóxicos circulantes en individuos presensibilizados contra los antígenos del injerto expresados en el endotelio vascular). Se produce liberación de mediadores de la inflamación (quininas, factores del complemento, activadores de la coagulación, enzimas, etc...) desencadenando trombosis vascular, hemorragia intersticial y necrosis isquémica del injerto. Se acompaña de niveles progresivamente más altos de transaminasas, coagulopatía e ictericia y, generalmente, de insuficiencia renal y alteraciones neurológicas. Aunque se puede intentar un tratamiento inmunosupresor intenso mediante corticoides, ciclosporina A y OKT3, la mayoría de estos pacientes requerirán retrasplante (37, 38).

3.2.2.-RECHAZO AGUDO.

Es una complicación muy frecuente. Entre un 50 y un 80% de los pacientes con trasplante hepático presenta algún episodio de rechazo en su evolución postoperatoria (39). Se presenta entre los seis días y las seis primeras semanas, si bien el 70% de los episodios tienen lugar en las dos primeras semanas (40). Su diagnóstico y tratamiento precoz son imprescindibles para la correcta evolución del injerto y del paciente.

Manifestaciones clínicas

Al inicio de un episodio de rechazo, el paciente suele presentar alguna de las siguientes manifestaciones clínicas:

-Astenia y anorexia marcadas

-Depresión neurológica, letargia

-Dolor en hipocondrio derecho

-Fiebre

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Alteraciones analíticas del rechazo

Siempre existen anomalías de la función hepática aunque se manifestarán en grado variable. Así podemos observar:

-Hiperbilirrubinemia, fundamentalmente a expensas de la fracción directa.

-Elevación de los enzimas de colestasis: Fosfatasas alcalinas y gamma-GT.

-Elevación de transaminasas.

-Descenso de la actividad de protrombina, a veces importante.

-Leucocitosis con neutrofilia y eosinofilia.

-Disminución en la secreción de lípidos, bilirrubina y pigmentos biliares.

Ante la inespecificidad clínica y analítica, el diagnóstico de rechazo se realizará descartando otras complicaciones y mediante biopsia y estudio citológico del espécimen hepático (37, 40, 41).

Aunque en otro capítulo se describen más detalladamente los signos histológicos de rechazo agudo, podemos referir brevemente que el diagnóstico se basa en la identificación del infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear de los espacios porta junto a daño tisular, evidenciado por la presencia de dicho infiltrado en la pared de las venas (endotelitis) y pared de los conductos biliares; el lobulillo hepático se afecta poco. En el estudio citológico del infiltrado se observan grandes linfocitos blásticos, linfocitos pequeños, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos (42, 43, 44, 45).

Una vez diagnosticado, se debe instaurar el tratamiento lo más precozmente posible, aumentando la inmunosupresión con corticoides a altas dosis (en bolos). Si no se obtiene buena respuesta, se considerará el rechazo corticorresistente y, tras repetir la biopsia para comprobar nuevamente el diagnóstico, se administrará la globulina antilinfocitaria monoclonal OKT3. Si fracasa dicho tratamiento se indica el retrasplante.

3.2.3.-RECHAZO CRONICO.

Consiste en una disfunción persistente del injerto consecuente a una lenta destrucción y fibrosis del mismo por un mecanismo inmunológico, predominantemente humoral, y se puede presentar semanas, meses o años después del trasplante. Las características de este cuadro son las siguientes (46):

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-Colestasis crónica progresiva: prurito, ictericia, elevación de los enzimas de colestasis (fosfatasa alcalina y gammaglutamiltransferasa), malabsorción y, en los estadíos avanzados, signos de hipertensión portal, como ascitis, circulación colateral y varices esofágicas.

-La histología hepática, base del diagnóstico, evidencia una fibrosis del injerto con pérdida de conductos biliares del espacio porta, dando lugar al llamado "vanishing bile duct syndrome", y la oclusión de las arterias de mediano calibre, por proliferación de la íntima que contiene macrófagos vacuolados. En ocasiones, estas lesiones biliares crónicas van precedidas de un cuadro biológico e histológico de rechazo agudo que, mantenido en el tiempo, evoluciona a la cronicidad.

El rechazo crónico es un proceso irreversible que no responde al tratamiento médico, por lo que su única solución es el retrasplante (47).

3.3.-Complicaciones infecciosas

Los pacientes con trasplante hepático presentan, con frecuencia, infecciones de diversa índole, apareciendo el 70% de las infecciones bacterianas graves y más del 90% de las virales, fúngicas e, incluso, parasitarias graves durante los tres primeros meses postrasplante (48).

3.3.1.-INFECCIONES ABDOMINALES.

Más del 15% de los pacientes presentan un absceso abdominal y suele estar relacionado con una intervención previa para solucionar una complicación quirúrgica (48). Si el absceso se localiza en el injerto hepático, habrá que buscar una posible estenosis de la anastomosis vascular o biliar (24). Los microorganismos más frecuentemente encontrados son los enterococos, bacilos entéricos gram negativos y los anaerobios.

La **colangitis** es una infección frecuente y suele estar relacionada con estenosis o fístulas de la vía biliar y con exploraciones instrumentadas (colangiografías, etc...). Las manifestaciones clínicas pueden ser inespecíficas y pueden dificultar el diagnóstico diferencial con el rechazo. En estos casos, es muy eficaz la biopsia hepática (que demuestra una pericolangitis neutrofílica) con cultivo microbiológico (48). Más recientemente, la citología

UNIVERSIDAD DE MURCIA

biliar se ha evidenciado como un método muy útil, ya que permite un diagnóstico rápido con alta fiabilidad; así, la demostración de abundantes neutrófilos y gérmenes en los frotis es indicativo de colangitis (13).

3.3.2.-INFECCIONES PULMONARES.

Las infecciones más importantes son la neumonía lobar, la bronconeumonía y la neumonitis intersticial.

La **neumonía lobar** es la más frecuente de ellas, siendo la etiología, generalmente, bacteriana (bacilos aerobios gram negativos). Se diagnostica en la primera semana y se relaciona con la ventilación mecánica y, por consiguiente, con largos periodos de intubación (48).

La **bronconeumonía** y la **neumonitis intersticial** suelen aparecer a partir de la tercera semana del trasplante. Los agentes causales suelen ser los virus (citomegalovirus, adenovirus), micoplasma pneumoniae, legionella, hongos o pneumocystis carinii (48).

3.3.3.-INFECCIONES DE TEJIDOS BLANDOS.

Las infecciones cutáneo-mucosas por el **virus del herpes** son muy frecuentes, aunque generalmente leves y fácilmente controlables. Otras más graves, si bien raras, son las **celulitis bacterianas**, cuya puerta de entrada suele ser la herida quirúrgica, y las **micosis invasivas** (48, 49).

3.3.4.-BACTERIEMIA.

Posee una alta morbi-mortalidad, siendo su origen, más frecuente, abdominal (48). Puede afectar al injerto, produciendo cierto grado de colestasis y reacción inflamatoria en las triadas portales, condicionando aparición de células inflamatorias en la bilis (13, 40). Plantea problemas de diagnóstico diferencial con el rechazo y la colangitis.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

3.4.-Recidivas de la enfermedad

En algunos pacientes, asistimos a la recidiva de la enfermedad por la que se indicó el TOH. Así ocurre en las **enfermedades neoplásicas** (hepatocarcinoma, colangiocarcinoma, tumores metastásicos neuroendocrinos) que pueden recidivar, generalmente, entre los 6 y 36 meses de la intervención (50).

La infección por **virus B** recidiva frecuentemente, a pesar de la inmunoprofilaxis pasiva, produciendo con relativa frecuencia hepatitis crónica del injerto, lo que empeora el pronóstico a largo plazo, en comparación con otras causas de hepatopatía crónica (50, 51). Situación similar está ocurriendo con el virus de la **hepatitis C**, con el que se ha descrito alta incidencia de recidiva (52). También se han descrito **hepatitis del injerto** producidas por otros virus como los herpesvirus (CMV, VHS, VEB) y adenovirus. Histológicamente se caracteriza por la presencia de microabcesos, microgranulomas y, en algunos casos, un infiltrado inflamatorio crónico portal, siendo variable la frecuencia con que se observan cuerpos de inclusión (53).

El **síndrome de Budd-Chiari** puede recidivar tras el TOH, aunque puede prevenirse con el tratamiento a largo plazo con anticoagulantes (54). Por último, algunos autores han descrito recidivas de **cirrosis biliar primaria**, pero su similitud histológica con el rechazo crónico y la no demostración en series largas ha hecho dudar de las mismas.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

PARTE SEGUNDA

BIOQUIMICA BILIAR. PUESTA AL DIA

1.-ANATOMIA HEPATOBILIAR Y FORMACION DE BILIS.

Una función importante del hígado es la secreción de bilis. La bilis es un fluido orgánico a través del cual el hígado secreta diversos componentes químicos, que cumplen importantes misiones en los procesos digestivos; así el colesterol, los fosfolípidos y, sobre todo, los ácidos biliares intervienen de forma directa en la digestión y absorción de las grasas. Pero la bilis también cumple una misión excretora, eliminando productos de desecho y metabolitos, potencialmente tóxicos para el organismo, con las heces.

El hepatocito es el principal responsable de los procesos de formación de bilis. En su polo sinusoidal, están en íntimo contacto con la sangre, de la que extraen los componentes necesarios para la síntesis biliar. Por su polo biliar secretan la bilis al canalículo. El canalículo biliar es el espacio que queda entre dos o más hepatocitos adyacentes. Estos canalículos se anastomosan entre sí y, finalmente, drenan en los conductillos biliares. Estos drenan en los conductos biliares que desembocan en el conducto hepático común, continuándose con el colédoco que desemboca en el duodeno.

En muchas especies, como el hombre, la bilis puede desviarse desde el conducto hepático a través del conducto cístico hacia la vesícula, donde se almacena y concentra, secretándose en los procesos digestivos.

La composición de la bilis es, en parte, dependiente del nivel del árbol biliar en que se encuentre (55). Los hepatocitos más próximos al flujo sanguíneo aferente (células periportales) son más activos en la secreción de ácidos biliares, mientras que los centrilobulillares lo son en la biotransformación y secreción de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo. En su trayecto por los canalículos, conductillos y conductos, la bilis modifica su composición por los procesos de absorción-secreción del epitelio biliar, la acción de los enzimas bacterianos y biliares, cambios bioquímicos en sus componentes, células descamadas, etc...

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2. HISTOLOGIA DEL SISTEMA BILIAR.

2.1.-Red Biliar Canalicular

Las vías biliares más elementales son, simplemente, espacios de 1 micra de diámetro en las hendiduras existentes entre los hepatocitos adyacentes, no recubiertos por células específicas. Los canalículos biliares forman una red que se extiende por todo el hígado, que puede observarse al microscopio óptico en muestras de tejido incluidas en parafina con tinciones especiales. También puede observarse en secciones congeladas fijadas en formol-calcio mediante la demostración histoquímica de la actividad ATP-asa o 5-nucleotidasa. Dicha red presenta numerosos divertículos pequeños (1-2 micras) hacia los hepatocitos, pero no comunica con la corriente sanguínea (56).

2.2.-Uniones Canaliculoductulares

La red canalicular está drenada por conductillos. La unión entre el canalículo y el conductillo consiste en un hepatocito y una o dos células ductulares que rodean una luz canalicular ligeramente dilatada (57). Las células ductulares poseen una membrana basal, en las superficies no adyacentes al hepatocito ni a la luz, que se extiende algunas micras más allá de las células ductulares, sobre la superficie del hepatocito. Los "canales de Hering" son una variedad de unión canaliculo-ductular, constituidas por más hepatocitos y más células ductulares que rodean una luz de mayor tamaño, y conductillos que tocan los hepatocitos en un lado y presentan una luz ductular regular en el centro.

2.3.-Conductillos Biliares

Las primeras estructuras celulares específicas del árbol biliar están constituidas por pequeñas células epiteliales cuboides o aplanadas de unas 10 micras de diámetro. La luz está rodeada de células (de dos a seis) y mide 2-20 micras de diámetro. La superficie luminal de la célula ductular presenta varias microvellosidades cortas (0.5-1 micra), pudiendo haber fragmentos de superficie de 3-4 micras de longitud desprovistos de microvellosidades.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Ocasionalmente, aparecen en la superficie luminal grandes vesículas citoplásmicas o vellosidades edematosas, mayores y más abundantes en las lesiones hepatocelulares, sobre todo cuando existe colestasis.

Las células ductulares están estrechamente unidas entre sí, a unas cuantas micras de la superficie luminal. Por debajo de la unión, el grado de aposición de una superficie celular lateral con la siguiente fluctúa según el estado funcional del conductillo. Hacia la parte basal de la porción lateral de las células, los bordes celulares adyacentes pueden estar separados entre sí por una distancia de más de 1 micra. Dicha distancia puede ser máxima cuando los conductillos intervienen en los fenómenos de reabsorción y secreción (58).

La superficie basal de la célula ductular es plana y descansa sobre una única membrana basal continua de 20-30 nm de grosor. La superficie celular está separada de la membrana basal por un área clara de 40 nm de anchura. Habitualmente un vaso sanguíneo de pequeño calibre acompaña al conductillo y las membranas basales de cada una de estas estructuras se funden con las adyacentes. La membrana basal se duplica o desarrolla multilaminaridad focal en la colestasis. Puede ser atravesada por leucocitos, linfocitos y macrófagos; los orificios producidos en ella por el paso de las células hacia el conductillo deben de cerrarse con rapidez, ya que ni siquiera se ven cuando hay células mesenquimales junto a las ductulares. La porción basal de la célula ductular puede estar separada de la membrana basal por una pequeña célula mal definida, denominada célula intercalada, cuyo origen y función se desconocen (56).

La célula ductular posee un núcleo redondo, central, de 5 micras de diámetro. El citoplasma es sencillo; presenta un amplio aparato de Golgi y ocasionalmente, cuerpos multivesiculares y lisosomas. Contiene unas cuantas mitocondrias y algunos perfiles de RER y REL. Algunas células ductulares poseen filamentos, algunos de los cuales son tonofilamentos unidos a los desmosomas de los complejos de unión y, otros, son microfilamentos contráctiles que confieren al conductillo cierto movimiento peristáltico.

Alrededor del conductillo se observa una cantidad variable de colágeno, en forma de haces de fibrillas, estrechamente unidas a la membrana basal. Cuando proliferan los conductillos rápidamente, como consecuencia de una lesión hística, se engruesa la envuelta de colágeno; a medida que los conductillos se extienden desde la zona próxima al espacio porta hacia el parénquima lobulillar, el espacio porta adopta una forma estrellada y se pueden formar tabiques

UNIVERSIDAD DE MURCIA

de tejido conjuntivo entre espacios porta adyacentes o entre los espacios porta y las venas centrales.

En la pared del conductillo aparecen también leucocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos. El tipo y número de células depende de la existencia o no de algún proceso inflamatorio del hígado; en el hígado normal aparecen, como máximo, unas pocas células inflamatorias. Sin embargo, en procesos inflamatorios, se encuentran abundantemente, incluso pueden pasar a la luz del conductillo y aparecer en bilis. Por ello, el estudio citológico de la misma puede tener gran interés diagnóstico (13, 40, 59).

Los conductillos del parénquima no van acompañados de arterias, venas ni linfáticos, aunque es posible encontrar estas estructuras en sus proximidades, ya que el conductillo atraviesa el espacio portal para penetrar en el conducto biliar.

2.4.-Conductos Biliares

A diferencia de los conductillos, se encuentran, exclusivamente, en los espacios porta y van acompañados siempre de una arteria y una vena. Las células de los conductos se hacen más columnares al crecer el conducto; en sección, la luz está rodeada por seis células, como mínimo. A medida que los conductos aumentan de tamaño, los núcleos adoptan una posición más basal. Cerca de la luz permanece una zona de Golgi prominente y la superficie luminal tiene forma de cúpula y presenta microvellosidades. Desde la luz de los conductos biliares intrahepáticos mayores, se extienden glándulas anexas mucosecretoras iguales que las de los conductos extrahepáticos (56).

3.-FISIOLOGIA DEL APARATO BILIAR

3.1.-Composición de la bilis hepática

La bilis es una compleja solución acuosa de componentes orgánicos e inorgánicos.

En general los componentes inorgánicos están presentes en la bilis a concentraciones estrechamente relacionadas con las del plasma. Las concentraciónes de sodio, potasio, calcio y bicarbonato pueden, sin embargo, ser apreciablemente más altas que en plasma, mientras que la

UNIVERSIDAD DE MURCIA

de cloro puede ser menor. La osmolalidad biliar también varía paralelamente con la plasmática y es aproximadamente de 300 mosmol/Kg.

Los principales componentes orgánicos de la bilis son los ácidos biliares, el colesterol y los fosfolípidos.

Los estudios para determinar la composición de la bilis hepática obtenida mediante un tubo en "T" o de KEHR se dificultan por el problema de mantener la circulación enterohepática de los ácidos biliares. La desviación de más del 20% del flujo biliar del colédoco produce cambios importantes en la composición de los lípidos biliares con una reducción en la concentración de los mismos, pero sobre todo de ácidos biliares (34, 60). También existen diferencias en la concentración de lípidos biliares entre varones y hembras (61). THUREBORN et al (62), en 1962, determinaron la concentración de lípidos biliares en mujeres colecistectomizadas por litiasis y portadoras de un tubo en "T", obteniendo los siguientes valores: ácidos biliares totales 41.3-102 mM/l, colesterol 2.6-5.2 mM/l, fosfolípidos 5.9-10.3. Posteriormente, en 1967, VAN DER LINDEN (63) determinó las concentraciones medias de los lípidos biliares en varones: 12.1+/-0.6 mM/l para fosfolípidos, y 7.59+/-0.34 mM/l para el colesterol. No encontró diferencias significativas en la concentración de colesterol atribuibles al sexo.

Aunque algunos autores encuentran diferencias en los niveles de lípidos biliares entre pacientes con patología litiásica y sin ella, no se ha demostrado que sean estadísticamente significativas (64).

3.1.1.-ACIDOS BILIARES.

Los ácidos biliares, en el hombre, se dividen en primarios y secundarios. Los ácidos biliares primarios son sintetizados en el hígado y, por la acción de la flora intestinal sobre ellos, se transforman en secundarios. Estos vuelven a circular, a través de los hepatocitos, hacia la bilis.

Los ácidos biliares primarios son el **ácido cólico** (cuya molécula posee tres grupos hidroxilo) y el **quenodesoxicólico** (con dos grupos hidroxilo); ambos son sintetizados en el hepatocito a partir del colesterol.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

La deshidroxilación, por parte de las bacterias intestinales, origina el **ácido desoxicólico** a partir del **cólico** y, el **ácido litocólico** a partir del **quenodesoxicólico**. Todos estos ácidos biliares se reabsorben en el intestino, aunque la absorción del ácido litocólico es escasa; se dirigen, vía portal, al hígado, siendo captados por el sinusoide hepático y secretados a los canalículos biliares de los hepatocitos. No se produce rehidroxilación.

Los ácidos biliares también se conjugan con **glicina** o **taurina** en el hígado, por lo que hay dos subtipos de cada ácido biliar. Las bacterias intestinales desconjugan los ácidos biliares. A concentraciones críticas forman agregados en solución denominados **micelas**, en las que las moléculas de ácido biliar están orientadas de manera que la porción hidrosoluble de la molécula se expone hacia la fase acuosa de la solución, mientras que la porción liposoluble mira hacia el interior. Si las moléculas se orientan tridimensionalmente de forma radial o rectangular, su interior se convierte en un hábitat liposoluble en el que muchos lípidos insolubles en agua, como el colesterol, pueden mantenerse en solución (55).

La concentración de ácidos biliares, en la bilis hepática, oscila entre 5 y 40 mM/l (65).

Los ácidos biliares desempeñan diversas funciones importantes (55, 58) :

-Regulan la síntesis de novo de colesterol.

-Acción detergente, solubilizando las grasas, especialmente el colesterol, mediante micelas mixtas, que favorecen su excreción y eventual pérdida por las heces.

-Controlan el flujo biliar, pues constituyen la principal fuerza osmótica del mismo. Por ello, cualquier afección hepática que altere la secreción de los ácidos biliares, afectará al flujo biliar total.

-Junto a la lecitina y colesterol intervienen en la absorción de las grasas en el intestino.

-Efectos específicos sobre las enzimas digestivas, actuando como cofactores de ciertas lipasas y protegiendo a otras de la digestión proteolítica.

3.1.2.-FOSFOLIPIDOS.

La concentración media de fosfolípidos totales en bilis es 164 g/ml, variando entre 1.9-11 mM/l. El 98% es **lecitina** (66) y el resto **cefalina**, **esfingomielina** y **lisolecitina.**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Los fosfolípidos son sintetizados en el hígado a partir del diacil glicerol. Además contienen un éster-fosfato unido a una base de nitrógeno. Los grupos polares de cabeza más comunes son la etanolamina, la colina y la serina que junto con las colas de hidrocarbonos no polares confieren a los fosfolípidos propiedades anfipáticas, de importancia vital para su función en las membranas (55).

3.1.3.-COLESTEROL.

Se encuentra en la bilis hepática en concentraciones de 2.5-8.2 mM/l (62, 63).

Es el principal esterol del reino animal y posee un núcleo que contiene el esqueleto de cuatro anillos del ciclopentanofenantreno y una cadena lateral alifática, así como un grupo hidroxilo en C3 en la configuración beta. Desempeña una importante función en la fluidez de las membranas eucariotas y es fundamental para el crecimiento y la viabilidad de las células en los organismos superiores. El colesterol puede obtenerse a partir de la dieta o ser sintetizado de novo (55).

3.1.4.-OTROS COMPONENTES ORGANICOS.

Las proteínas están presentes en la bilis hepática en forma de proteínas plasmáticas, glucoproteínas biliares, inmunoglobulinas (Ig G, M y A) y enzimas, como fosfatasa alcalina (FA) aspartatoaminotransferasa (AST), gammaglutamiltransferasa (GGT), leucinoaminno peptidasa (LAP), 5-nucleotidasa, etc...

La concentración media de proteínas en la bilis hepática es de 0.04 mg/l (67), y depende de la secreción de los ácidos biliares y de la acción de las hormonas gastrointestinales (68).

3.2.-Factores que influyen en la composición de la bilis

Estudios a largo plazo demuestran una variación diurna en la composición lipídica de la bilis en sujetos normales (69).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Situaciones de ayuno prolongado conllevan una elevación constante de la concentración de colesterol (55).

Se han encontrado diferencias en la composición biliar entre varones y mujeres, de forma que las concentraciones de ácidos biliares totales, ácido quenodesoxicólico y ácidos conjugados con glicina y taurina eran superiores en mujeres, si bien los varones presentaban un porcentaje superior de ácidos biliares totales en forma de ácido cólico (61). Estos estudios no evidencian diferencias en las concentraciones relativas de los lípidos biliares entre hombres y mujeres (61).

La administración de estrógenos produce un aumento del porcentaje de moles de colesterol y fosfolípidos, disminuyendo el de ácidos biliares (70). BENNION et al (71) demostraron que la toma prolongada de contraceptivos orales elevaba el porcentaje de moles de colesterol, pero la concentración biliar permanecía invariable.

La dieta influye en la composición biliar. Dietas hipercalóricas y ricas en colesterol aumentan la concentración de colesterol biliar (72). Alteraciones vitamínicas, fundamentalmente hiper o hipovitaminosis C, conllevan una disminución de la síntesis de ácidos biliares, por disminución de la actividad de la colesterol 7-alfa-hidroxilasa.

La interrupción de la circulación enterohepática en más del 20% del flujo normal a través del colédoco produce cambios en la composición de la bilis hepática. Se ha visto experimentalmente que dichos cambios se empiezan a observar a partir de las dos o tres horas de la interrupción, hipersaturándose de colesterol la bilis. No obstante varias horas después aumenta la tasa de síntesis de ácidos biliares, alcanzando el equilibrio que mantiene la solubilidad del colesterol. Aunque la interrupción de la circulación enterohepática tiende a disminuir la concentración de los lípidos biliares, lo hace en mayor medida en los ácidos biliares (60).

La colecistectomía supone la pérdida de la capacidad de concentración de la vesícula, no siendo compensada por la de los conductos biliares, lo que conlleva una bilis más diluida (55).

Finalmente, determinados fármacos pueden modificar la composición biliar. La cloroquina, el taurohidrocolato, la diosgenina, etc... elevan la concentración de colesterol, mientras que otros como la vimblastina, faloidina, colchicina y ciclobutirol la disminuyen (55).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

La ciclosporina, fármaco utilizado en la profilaxis y tratamiento del rechazo en pacientes trasplantados, puede modificar la secreción biliar; sus efectos se comentarán más adelante.

3.3.-Mecanismos de formación de bilis hepática

3.3.1.-FORMACION DE BILIS CANALICULAR.

La bilis se forma continuamente en los canalículos biliares y se modifica por la secreción y absorción en la vesícula (55). La bilis canalicular es el resultado de un proceso de filtración osmótica, pudiendo ser secretada contra presión mayor que la sanguínea y contra gradiente, en virtud de dos mecanismos relacionados con el trasporte activo de sodio (73). Estos son:

A) Mecanismo de formación de bilis canalicular dependiente de los ácidos biliares.

La secreción de ácidos biliares a través de la membrana plasmática canalicular del hepatocito es la principal fuerza impulsora de la formación de bilis canalicular. La actividad osmótica de los ácidos y sales biliares en el líquido canalicular provoca la secreción de agua y electrolitos .

Este mecanismo se divide en tres fases:

-FASE SINUSOIDAL

Comprende la captación de los ácidos biliares de la sangre sinusoidal por el hepatocito mediante una ATPasa de Na^+ y K^+ en la membrana basolateral. El hepatocito posee una bomba de Na^+ y K^+ dependiente de la ATPasa que mantiene una concentración baja de Na^+ en el interior del hepatocito. Puede producirse consecuentemente un transporte, facilitado por un transportador, de Na^+ y un anión (los ácidos biliares), contra gradiente eléctrico.

-FASE INTRACELULAR

Los ácidos biliares son transportados hacia el polo biliar en forma de vesículas, hasta la membrana citoplasmática.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-FASE CANALICULAR

La secreción de ácidos biliares al canalículo probablemente se produce por transporte vesicular y exocitosis, aunque también intervienen el potencial electroquímico a través de membrana (74) y las microvellosidades canaliculares (55).

B) Mecanismo de formación de bilis canalicular independiente de los ácidos biliares.

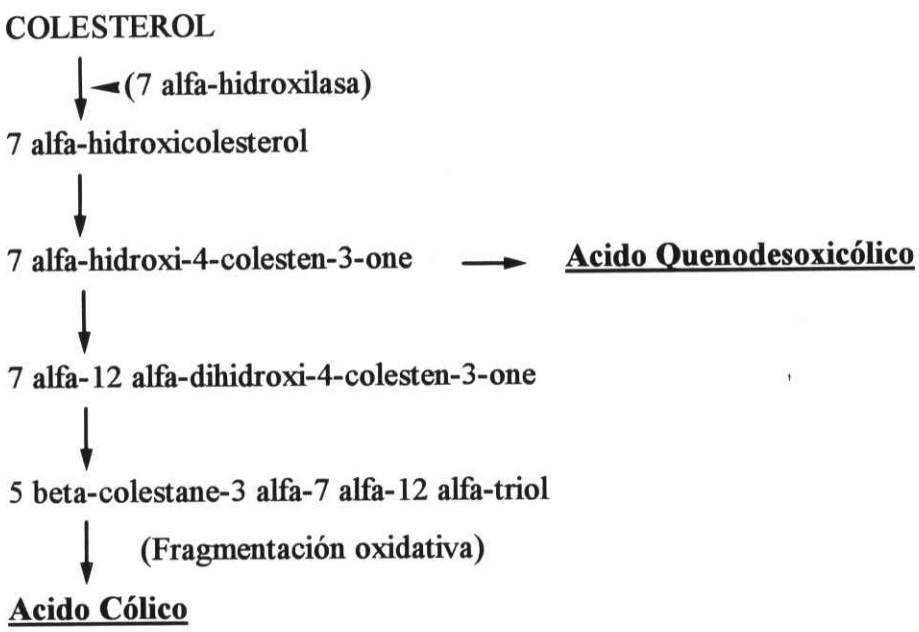
Se ha demostrado la existencia de una relación lineal entre la secreción de ácidos biliares y el flujo biliar (73). Sin embargo, cuando la secreción de aquellos se extrapolaba a cero, se mantiene en grado importante el flujo biliar, lo que indica la existencia de una fracción de secreción biliar independiente de los ácidos biliares (55, 73).

Este mecanismo es dependiente de una ATPasa de Na^+ y K^+ en la membrana basolateral (75). El transporte de Na^+, ácidos biliares y otros aniones aumentan las fuerzas osmóticas en el líquido canalicular y el flujo biliar. En el hombre, se ha calculado que el flujo de bilis canalicular independiente de los ácidos biliares, supone el 35-40% (1.5-2 mg) del flujo basal (73).

3.3.2.-MECANISMOS DE FORMACION Y SECRECION DE LOS ACIDOS BILIARES.

Los ácidos biliares primarios (cólico y quenodesoxicólico) se sintetizan en el hepatocito a partir del colesterol. Constituyen el 85-90% de los ácidos biliares circulantes en personas normales. En circunstancias fisiológicas más del 99% de los ácidos biliares secretados a la bilis están conjugados con glicina o taurina, lo que disminuye su pK e incrementa su solubilidad a pH intestinal (76). Existen seis pasos principales en la conversión de colesterol a ácido cólico; los cuatro primeros son reacciones de hidroxilación por enzimas microsómicas; los dos últimos son modificaciones de la cadena lateral, mediante reacciones de fragmentación oxidativa, por enzimas mitocondriales. De forma esquemática, los pasos en la síntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol son los siguientes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA



El principal paso limitante en la biosíntesis de ácidos biliares lo constituye la 7 alfa-hidroxilación del colesterol, realizada por la enzima microsomal colesterol-7 alfa-hidroxilasa. Diversos factores pueden modificar su acción influyendo, por lo tanto, en la síntesis de ácidos biliares (76):

-Los ácidos biliares ejercen un "feedback" negativo sobre dicha enzima, controlando su propia síntesis.

-Ritmo circadiano, mostrando una mayor actividad diurna. En algunos roedores, que se alimentan por la noche, la enzima manifiesta mayor actividad nocturna (77).

-Determinadas hormonas, como el cortisol, la GH, TH, estimulan la actividad de la colesterol-7 alfa-hidroxilasa, mientras que determinados estrógenos la disminuyen.

Aunque la fundamental vía biosintética de los ácidos biliares es la descrita, diversos estudios realizados por VLAHCEVIC et al. (76) demuestran la existencia de otras vías independientes de la colesterol-7 alfa-hidroxilasa.

La vida media de los ácidos biliares es de 2-4 días. Su ciclo metabólico completo comprende la síntesis y secreción por el hígado, la absorción desde el íleon terminal y la resecreción por el hígado (78). En individuos normales, la reserva de ácidos biliares circula seis

UNIVERSIDAD DE MURCIA

veces al día. Una pequeña fracción no es reabsorbida, eliminándose con las heces, pero el hígado sintetiza una cantidad equivalente manteniendo el equilibrio.

3.3.3.-MECANISMOS DE FORMACION Y SECRECION DE FOSFOLIPIDOS.

Los fosfolípidos biliares proceden en un 95% de la reserva o pool hepática, que se nutre de los fosfolípidos de las membranas de las células hepatobiliares (sobre todo del retículo endoplásmico), de los contenidos en las lipoproteínas plasmáticas, y de los obtenidos a partir de ácidos grasos (palmitoil y linoleil fosfatidilcolina). La síntesis de novo aporta el 5% del total (55, 79).

Los ácidos biliares intervienen en estos procesos, estimulando la captación de lipoproteínas plasmáticas por el hepatocito para su posterior transformación en fosfolípidos, la síntesis hepática y la secreción de los mismos en bilis (79).

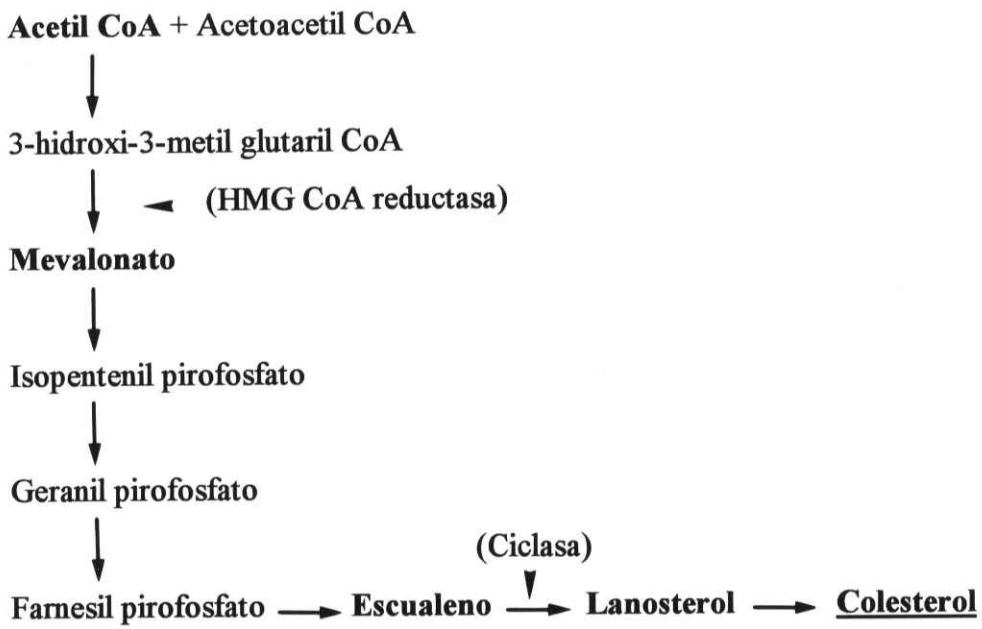
El principal fosfolípido biliar es la fosfatidilcolina o lecitina, aunque también están presentes la esfingomielina y la fosfatidiletanolamina (66).

Diariamente se secretan hacia la bilis 300-600 mg de fosfolípidos. Su papel es fundamental, manteniendo soluble al colesterol y atenuando el efecto detergente de los ácidos biliares hacia las células del sistema hepatobiliar.

3.3.4.-MECANISMOS DE FORMACION Y SECRECION DE COLESTEROL.

El hígado sintetiza el colesterol a partir del acetilcoenzima A. Los productos intermedios principales son beta-hidroxi-beta-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mevalonato, escualeno y lanosterol. El paso limitante fundamental es la reducción de HMG-CoA a mevalonato, por la acción enzimática de la HMG-CoA reductasa. El esquema de la síntesis del colesterol es el siguiente:

UNIVERSIDAD DE MURCIA



El hígado y el intestino sintetizan el 90% del colesterol, aunque la mayoría de los tejidos del adulto poseen los enzimas necesarios para ello.

La secreción de colesterol en la bilis, bien directamente en forma no esterificada o bien en forma de ácidos biliares, constituye la principal vía de eliminación de colesterol del organismo. Parte del mismo procede de la síntesis de novo (alrededor del 20%), y la mayor parte procede de la reserva preformada. Dicha reserva procede fundamentalmente de las lipoproteínas LDL y HDL. La gran reserva de colesterol libre se encuentra en las membranas de los hepatocitos y es regulada por la acción de la colesterol aciltransferasa (que trasforma la forma libre de colesterol en esterificada, disminuyendo la secreción en bilis) y por la colesteril ester hidrolasa (realiza el proceso inverso, aumentando el colesterol libre y por tanto su concentración en bilis) (55).

En humanos se secretan en la bilis 25-85 mg de colesterol al día (80). La secreción de colesterol es en parte dependiente de la de ácidos biliares, pudiendo secretarse en ausencia de los mismos (73, 81).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

3.3.5.-PAPEL DE LOS CONDUCTOS BILIARES EN LA FORMACION DE BILIS.

La bilis, en su recorrido por los conductos biliares, sufre procesos de absorción y secreción que modifican su composición y volumen (55, 58, 82, 83). La secreción de la bilis ductal es estimulada por la secretina y otras hormonas (colecistokinina, gastrina) (82).

La secreción de agua por el sistema ductal depende principalmente del transporte activo de bicarbonato. El potasio se secreta de forma pasiva, y la de sodio probablemente de forma activa por una bomba de Na^+/Cl^- (83). Aunque la bilis hepática suele ser isotónica respecto al plasma, ocasionalmente puede hacerse hipertónica por reabsorción de agua por las células ductales. En virtud de esa capacidad absortiva, la bilis de los conductos puede alcanzar una concentración y composición similares a la vesicular (84).

4.-LOS LIPIDOS BILIARES EN EL PACIENTE PORTADOR DE TUBO EN "T" DE KEHR.

Una forma de obtener muestras de bilis seriadas para su estudio la aportan los pacientes que llevan un tubo de drenaje biliar en "T" o de KEHR. Este hecho implica una serie de cambios en la composición lipídica biliar: Por un lado, va a producir una pérdida parcial de bilis al exterior, comportándose como una fístula biliar, interrumpiendo parcialmente la circulación enterohepática. Por otro lado, utilizamos como valores de referencia los datos bioquímicos de la bilis de pacientes afectos de litiasis biliar, que como ya se mencionó anteriormente, puede presentar algunas diferencias en las concentraciones lipídicas respecto a la de sujetos normales. A pesar de ello, los lípidos biliares de dichos pacientes suelen mantenerse dentro del rango de normalidad y son perfectamente válidos, como referencia, para el estudio de la función hepática (73).

La interrupción de la circulación enterohepática en más del 20% del flujo normal a través del colédoco, modifica la composición de la bilis hepática, afectando sobre todo a los ácidos biliares. Así, se ha demostrado en monos que, a las 3-4 horas de la interrupción aguda de la circulación enterohepática , comienza a alterarse la composición lipídica, de forma que la bilis se hipersatura de colesterol. Pocas horas después se produce un aumento en la síntesis de

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ácidos biliares, alcanzando el estado de equilibrio (60). Otros estudios realizados en ratas, a las que se les producía una fístula biliar, evidenciaron un aumento en la producción de ácidos biliares (85). MYANT y HEBER, en 1961 (86), demuestran un aumento en la síntesis de colesterol incluso previo al de ácidos biliares al derivar la bilis fuera del intestino. Todas estas fueron las primeras evidencias de la existencia de un "feed-back" negativo que ejercen los ácidos biliares sobre las enzimas colesterol-7alfa-hidroxilasa y HMG-CoA reductasa, de forma que al interrumpirse la circulación enterohepática y depleccionarse la reserva de ácidos biliares, aumenta, progresivamente y mientras se mantenga la pérdida de ácidos biliares, la acción de dichos enzimas.

En 1971, SCHERSTEN et al. (81), analizando la bilis en 5 pacientes colecistectomizados portadores de un tubo de KEHR, demuestran una caída inicial en la secreción de ácidos biliares, lo que suponía una disminución en la producción de los fosfolípidos y colesterol, que se normalizaba tras la infusión de ácidos biliares por sonda duodenal, es decir, tras restablecer la circulación enterohepática.

PRANDI et al. (73) estudian el flujo y composición lipídica biliar en 8 pacientes portadores de tubo de KEHR, colecistectomizados por litiasis pero sin coledocolitiasis. Obtenían, diariamente durante dos semanas, muestras de bilis del tubo y determinaban los lípidos biliares. Observaron que el flujo biliar era muy bajo los primeros días postoperatorios (250-300 ml/día), y aumentaba progresivamente hasta el 7° día p.o. (660-700 ml/día) manteniéndose en esos valores durante la segunda semana. Los lípidos biliares se comportaron de forma similar, de manera que el nivel de secreción de los mismos era muy bajo el primer día postoperatorio y aumentaba, progresivamente, durante la primera semana, estabilizándose durante la segunda semana postoperatoria. Demostraron, pues, que la interrupción de la circulación enterohepática depleccionaba inicialmente la reserva de ácidos biliares, decayendo su secreción en bilis, lo que conllevaba una disminución paralela de la secreción de fosfolípidos, colesterol y del flujo biliar; conforme el hígado iba aumentando la síntesis y secreción de ácidos biliares, para mantener el equilibrio, aumentaban las concentraciones de los otros lípidos y el flujo biliar. PANDAK y VLAHCEVIC (87, 76) confirmaron estos hechos y demostraron la acción inhibitoria de los ácidos biliares sobre la enzima colesterol-7 alfa-hidroxilasa, que desaparecía parcialmente al derivar la bilis al exterior mediante un tubo de KEHR.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

5.-VALOR DIAGNOSTICO DEL ESTUDIO BIOQUIMICO DE LA BILIS EN PACIENTES CON TRASPLANTE ORTOTOPICO DE HIGADO.

5.1.-Problemática de la monitorización de la función del hígado trasplantado.

El control postoperatorio del paciente trasplantado es esencial para un buen resultado final. A pesar de los avances en la técnica quirúrgica, mejor selección del órgano donante, obtención de mejores líquidos de preservación y tratamientos inmunosupresores, el injerto está sujeto a la aparición de complicaciones. La lesión isquémica del hígado donante, la disfunción primaria del injerto, la isquemia por trombosis vascular, las complicaciones derivadas de la anastomosis biliar, la toxicidad por fármacos, las infecciones, la recidiva de la enfermedad y, sobre todo, el rechazo constituyen la causas más frecuentes de la alteración del injerto hepático (18, 88). El diagnóstico precoz de las alteraciones del injerto, y su inmediato tratamiento, es un reto para el intensivista, cirujano y/o digestólogo que, dada la variabilidad e inespecificidad de sus manifestaciones clínicas, están obligados a realizar una minuciosa evaluación clínica y bioquímica diaria del injerto.

Por otra parte, el paciente trasplantado presenta, con frecuencia, una enfermedad hepática terminal, previa a la intervención, lo que implica alteraciones renales, electrolíticas, metabólicas, ascitis y un mayor o menor grado de colestasis (89).

El trasplante, en sí, también induce cambios metabólicos, fruto de la propia intervención, con una inevitable pérdida de sangre y, de los disturbios de la fase anhepática, y de la fase de revascularización del injerto, con el inevitable paso a la circulación sistémica de metabolitos tóxicos (sobre todo los radicales libres) producidos en el periodo de isquemia.

Todos estos aspectos dificultan, aún más, el control postoperatorio del paciente trasplantado y obligan a los especialistas responsables del mismo a extremar la vigilancia, utilizando para ello todos los métodos diagnósticos clínicos, bioquímicos, radiológicos e, incluso, anatomopatológicos de que dispongan. Así, el control rutinario, diario, de estos pacientes incluye:

-Examen clínico completo.

-Analítica completa: hemograma, iones, coagulación (actividad de protrombina), bilirrubina (total y conjugada), fosfatasa alcalina (FA), aspartato aminotransferasa

UNIVERSIDAD DE MURCIA

(AST o GOT), alaninoaminotransferasa (ALT o GPT), gammaglutamil transpeptidasa (GGT), lacticodeshidrogenasa (LDH) y albúmina.

-Ecografía hepática y abdominal y Eco-doppler, en determinados casos.

-Biopsia hepática, en determinados casos.

Por otra parte, el nuevo hígado comienza a funcionar con un variable grado de lesión, debida a las alteraciones hemodinámicas durante la fase de extracción y a la isquemia (89). Posteriormente está sujeto a la aparición de diversos eventos patológicos, ya mencionados.

El diagnóstico de las complicaciones se basa, por lo general, en los signos clínicos, test analíticos y, eventualmente, en la biopsia hepática. No obstante, dada la inespecificidad de la analítica sérica y los riesgos de la biopsia, sobre todo al tener que realizarla repetidamente, se han buscado otras alternativas diagnósticas, que permitan un control sistemático de la función del nuevo hígado y detecten sus alteraciones de forma precoz, antes de un deterioro irreversible.

En este sentido, el estudio de la composición bioquímica de la bilis producida por el hígado trasplantado puede reflejar el estado funcional del mismo. Los lípidos (colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares) son el principal componente de la bilis, de forma que una correcta función del hígado supone una concentración adecuada de los mismos, y se ha comprobado que las alteraciones de la función hepática se traducen en cambios en la concentración lipídica (14, 34, 89, 90, 91, 92).

5.2.-Composición de la bilis del hígado trasplantado. Lípidos biliares.

La composición de la bilis del hígado trasplantado varía según el estado funcional del mismo, modificable por los diversos eventos específicos que puede sufrir.

El nuevo hígado, previa a su revascularización, ha sufrido un periodo de isquemia que se acompaña indefectiblemente de cierto grado de lesión, lo que conlleva una merma en la síntesis de bilis, especialmente de los lípidos, que aparecerán a bajas concentraciones los primeros días del postoperatorio.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Como ya se mencionó al inicio de este capítulo, los hepatocitos más activos en la síntesis y secreción de ácidos biliares son los localizados próximos al flujo sanguíneo aferente, es decir, los periportales, mientras que los centrilobulillares lo son más en la biotransformación y eliminación de metabolitos tóxicos para el organismo (55). Por ello, los hepatocitos periportales, en situaciones de compromiso del flujo sanguíneo aferente, como ocurre en las distintas fases de la intervención quirúrgica en el TOH, sufren isquemia en grado variable que, funcionalmente, se va a traducir en una disminución de la capacidad de síntesis y secreción de ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol (14, 89). Por ello, los primeros días del postoperatorio de los pacientes con TOH, se acompañan de una baja excreción de bilis por el tubo de KEHR que contiene concentraciones bajas de lípidos biliares (especialmente de ácidos biliares).

HAAGSMA et al. (89) estudian la composición de la bilis en 20 pacientes con TOH. Obtienen muestras diarias, durante los primeros 21 días del postoperatorio, por el tubo en "T" y determinan las concentraciones de colesterol (por método colorimétrico), fosfolípidos (método colorimétrico) y ácidos biliares (método enzimático Sterognost 3-alfa Pho), comparándolas con las de pacientes colecistectomizados por colelitiasis portadores de un tubo en "T" en el colédoco. Observan que los pacientes trasplantados, en las dos primeras semanas, producen bilis con unas concentraciones de ácidos biliares y colesterol significativamente más bajos. Durante la tercera semana, el hígado trasplantado aumenta considerablemente la síntesis y secreción lipídica biliar, aunque sin alcanzar los niveles observados en los pacientes colecistectomizados. Por otra parte, evidenciaron que cuando aparecía algún episodio de rechazo severo los valores caían súbitamente, incluso por debajo de los valores normales, más por alteraciones en la excreción que en la síntesis hepática. Dicha caída también se observó en otras alteraciones como la trombosis de la arteria hepática y cualquier proceso sistémico que conllevase severo daño de la función hepática. No obstante, no encontraron utilidad en el estudio biliar para la predicción del grado histológico del rechazo o del pronóstico del paciente, probablemente por el escaso número de pacientes con rechazo severo que tenían en su serie.

En 1989, BOWERS et al. (90) monitorizan la secreción biliar en 5 pacientes con TOH, a través del tubo de Kehr, midiendo el flujo de bilis (volumen diario), concentración media de los lípidos biliares (colesterol por el método de Abell, fosfolípidos por el de Fiske-Subbarow, y los ácidos biliares por el 3-hidroxiesteroide dehidrogenasa) y de proteínas (método de Lowry). Evidencian una secreción baja de bilis y lípidos durante la primera semana postoperatoria,

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

alcanzando valores similares a los de pacientes no trasplantados a partir de la segunda semana (alrededor del 10° día postoperatorio), coincidiendo con el clampaje del tubo de Kehr y el inicio de la dieta y, por lo tanto, con el restablecimiento de la reserva de ácidos biliares (que mediatizan de forma importante la secreción de los otros lípidos y el flujo biliar). En un paciente, la caída súbita del flujo biliar señaló el establecimiento de una trombosis de la arteria hepática que requirió reintervención. Tras su experiencia, señalan que el análisis biliar es un método útil para el control postoperatorio del paciente con TOH.

En 1990, ERICZON et al.(14, 91) estudian las características del metabolismo lipídico en 10 pacientes trasplantados portadores de un tubo en "T", durante las tres semanas consecutivas a la intervención. Determinaron, por métodos similares a los descritos (colesterol: método enzimático; fosfolípidos: método de Rouser, Sydney y Akira; ácidos biliares: método 3-hidroxiesteroide dehidrogenasa), las concentraciones de los lípidos biliares correlacionándolas entre sí y con los datos clínicos y analítica sérica (perfil hepático) de los pacientes. Demostraron una producción de lípidos, en la primera semana postoperatoria, por debajo de los valores obtenidos en pacientes colecistectomizados, normalizándose en la segunda semana, interpretando que es el tiempo necesario para el restablecimiento del hígado del daño isquémico (por la preservación). Durante los episodios de rechazo caían dichos valores, simultáneamente a la elevación de transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina en sangre. Cuando el tratamiento antirrechazo fue eficaz se restablecieron rápidamente los niveles de lípidos en bilis, antes que los datos séricos. Los pacientes que desarrollaron trombosis de la arteria hepática y disfunción primaria del injerto presentaron una producción lipídica escasa o nula. Observaron también, como en estudios previos en pacientes colecistectomizados, que la mayoría del flujo lipídico era dependiente de la secreción de ácidos biliares, existiendo una pequeña fracción independiente de ellos, que se evidenciaba cuando la producción de ácidos biliares era nula. Concluyen, señalando que el análisis biliar no aportaba más que los test séricos habituales para el diagnóstico precoz de las alteraciones del hígado trasplantado, excepto en la valoración de la eficacia del tratamiento contra el rechazo.

La aparición precoz de litiasis en la vía biliar de los pacientes trasplantados sugirió la existencia de alteraciones en la concentración de los lípidos biliares de forma que aumentasen el índice de litogenicidad biliar. Así, WALDRAM et al. (34) en 1975, evidenciaron la aparición de cálculos o barro biliar en tres pacientes trasplantados, entre el primer y segundo mes del

UNIVERSIDAD DE MURCIA

postoperatorio. Estudiaron la composición lipídica de la bilis, obtenida por el tubo en "T". Describieron supersaturación de colesterol por déficit relativo de fosfolípidos y ácidos biliares. Dicho déficit fue atribuido a la deplección que supone la interrupción del reciclaje enterohepático por el tubo en "T" y a la disminución en la capacidad sintética del hígado durante los episodios de rechazo. Observaron un aumento relativo del ácido cólico y un descenso marcado del desoxicólico, predominando las formas conjugadas con glicina. Por otra parte el estasis biliar, las células descamadas, y el daño de las vías biliares por la isquemia favorecerían la aparición de litiasis. Estos autores no encontraron, no obstante, aumento significativo en la viscosidad de la bilis.

En 1991 FAROUK et al. (92), analizan la bilis de 6 pacientes trasplantados y la comparan con la de 9 pacientes colecistectomizados por colelitiasis, todos ellos portadores de tubo de Kehr, tratando de explicar la aparición precoz de cálculos en algunos pacientes trasplantados. Objetivan una secreción significativamente menor de lípidos en el grupo con TOH hasta la segunda semana, a partir de la cual se normaliza. También observaron, en dicho grupo, un aumento rápido de la saturación del colesterol en la primera semana por un déficit relativo mayor de ácidos biliares. Con el clampaje del tubo de Kehr alrededor de la 2ª semana postoperatoria y la recuperación de estos disminuyó la saturación, pero siempre con valores por encima del primer día, lo que demostraba que la supersaturación era un fenómeno que sigue al trasplante. No obstante, no encontraron correlación entre la saturación de colesterol y el ulterior desarrollo de litiasis. Solo en la primera semana se observó una saturación similar o mayor a la del grupo de coledocolitiasis.

5.3.-Efectos de la ciclosporina en la secreción biliar

La ciclosporina A (CyA) es un péptido cíclico, neutro, muy lipofílico procedente del hongo *Tolypoclaudium inflatum Gams*. Actúa inhibiendo, especificamente, la producción de interleuquina 2 (IL-2) y otras citoquinas por los linfocitos T y disminuye la respuesta del linfocito T precitotóxico a la interleuquina; también inhibe al interferón gamma, potente inductor de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II, liberado por los linfocitos T activados. No es mielotóxica ni tiene acción in vivo sobre linfocitos B,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

polimorfonucleares ni macrófagos (93, 94, 95). Se puede administrar por vía oral (se absorbe en el intestino delgado proximal, precisando de la presencia de bilis) e intravenosa.

La CyA produce frecuentes efectos secundarios durante los primeros meses de tratamiento, la mayoría de ellos dosis-dependientes y reversibles. Las complicaciones más importantes aparecen en riñón (nefrotoxicidad) y en el SNC (convulsiones, temblores, hipoestesia...). Otras complicaciones son HTA, acidosis metabólica hiperclorémica, hipercalemia, hiperuricemia, hiperglucemia, hipercolesterolemia y hepatotoxicidad (96, 97).

La hepatotoxicidad es una complicación poco frecuente. Clínica e histológicamente se va a manifestar como un cuadro de colestasis, con aumento sérico de bilirrubina, fosfatasa alcalina y discreta elevación de transaminasas. Responde bien a la reducción de la dosis de CyA. Algunos pacientes tratados con CyA han desarrollado coledocolitiasis, quizá debido a un aumento en el índice de litogenicidad de la bilis. La disminución en la secreción biliar y la colestasis por el tratamiento con ciclosporina ha sido descrito por múltiples autores (98-102). SCHADE et al. (98), en 1983, describe la aparición de colestasis en pacientes con trasplante cardíaco tratados con ciclosporina. En 1986, ROTOLO et al. (99), evidencian efectos colestásicos en ratas tratadas con ciclosporina. Demuestran un efecto inhibitorio en la producción de ácidos biliares y por tanto en la secreción biliar en dichos animales. En 1987, STONE et al.(100), objetivan una inhibición en el trasporte vesicular de los lípidos en el hepatocito de las ratas tratadas con ciclosporina. Estos resultados fueron confirmados posteriormente, en 1988, por LE THAI (101) y en 1990 por ROMAN et al. (102).

Sin embargo, otros autores no observan efectos significativos de la ciclosporina en la secreción biliar de pacientes con TOH (92, 103). FAROUK et al. (92), en 1991, no encontraron disminución en la síntesis de ácidos biliares en seis pacientes con TOH tratados con ciclosporina, respecto a nueve pacientes colecistectomizados por litiasis. En 1991, THEILMANN et al. (103), demuestran una secreción normal de lípidos biliares y bilirrubina en nueve pacientes con TOH, en tratamiento con ciclosporina, a pesar de tener signos bioquímicos en suero de colestasis (aumento discreto de fosfatasa alcalina, GGT y bilirrubina).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

5.4.-Efectos de la denervación del hígado en la secreción biliar

El aparato biliar está inervado por el sistema nervioso autónomo, recibiendo fibras vagales (parasimpáticas, con acción colerética) y simpáticas (acción anticolerética). Las fibras vagales discurren por la rama hepática del tronco vagal anterior (derecho), y las simpáticas proceden del plexo celíaco; de ambas hay tanto aferentes como eferentes. Las neuronas adrenérgicas (simpáticas) inervan el músculo liso de la vesícula biliar. Las fibras aferentes que conducen las sensaciones dolorosas de la vía biliar discurren por los nervios simpáticos hacia los ganglios celíacos y desde ellos a la médula espinal (104).

Para determinar la influencia nerviosa sobre la secreción lipídica biliar, YAMATANI et al. (105), en 1985, mediante experiencias "in vitro" (con hígados aislados perfundidos), evidenciaron que el estímulo adrenérgico ejercía un efecto colestásico, disminuyendo la secreción de sales biliares. LEUZEN et al. (106), en 1987, demuestran, "in vitro", que el estímulo adrenérgico inhibía la acción colerética del glucagón y secretina, por vasoconstricción portal; se dificulta el aporte de ácidos biliares al hepatocito, disminuyendo la secreción de los mismos al canalículo. Dicho mecanismo está mediado por una disminución de AMPc. Estos estudios "in vitro" demuestran que la denervación permitiría la acción colerética de determinadas hormonas, como la secretina y el glucagón.

La disección de los pedículos hepáticos y su sección, en el TOH, supone la denervación del injerto. Para objetivar su repercusión en la secreción biliar "in vivo", CUCCHIARO et al. (107), en 1992, mediante un estudio experimental realizado en perros, demuestra que la denervación del hígado no induce cambios en el flujo ni en la composición lipídica biliar, ni modifica la sensibilidad de los hepatocitos y células ductulares a la acción hormonal de la secretina y el glucagón.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

PARTE TERCERA

PAPEL DIAGNOSTICO DE LA CITOLOGIA BILIAR

1.-ANTECEDENTES HISTORICOS

La primera descripción del análisis citológico biliar fue dada por LEMON y BYRNES en 1949 (108), evidenciando la importancia del estudio de las células que aparecen en los aspirados duodenales para el diagnóstico de neoplasias de la vía biliar y páncreas. Estimulaban la secreción bilio-pancreática con sulfato de magnesio y secretina, y extraían muestras del jugo duodenal; con ellas, realizaron frotis, buscando células malignas, y obtuvieron una sensibilidad del 65%, sin falsos positivos.

Posteriormente, en 1962, NIEBURGS et al. (109) establecieron el diagnóstico de determinadas patologías biliopancreáticas basándose en el estudio de los frotis obtenidos por sondaje duodenal.

El análisis citológico también se reveló muy útil para el diagnóstico de enfermedades hepáticas. Así, en Estados Unidos, SHERLOCK et al. (110), en 1967 y GROSSMAN et al. (111) en 1972, realizan frotis con los fluidos y secreciones que acompañan al tejido obtenido en las biopsias hepáticas, realizadas a pacientes con sospecha de tumoración maligna de hígado. La citología mostró una eficacia del 100%.

En Europa, diversos investigadores utilizaron la técnica de Biopsia-Citología por Aspiración con aguja fina (BCA o PAAF), técnica creada por MARTIN, ELLIS y STEWART (112, 113) en los años treinta. Desde entonces ha sido utilizada por múltiples autores: FIESSINGER et al. en 1938 (114); WEIL en 1938 (115); HATIEGANU et al. en 1943 (116); LOPEZ CARDOZO, 1954 (117); BOCK, 1958 (118); NIEBURGS et al., 1959 (119); SODERSTROM, 1966 (120). LUNDQUIST et al. en 1970 (121) realizan punciones aspirativas con aguja fina (de 0.7 mm de diámetro) a enfermos con la sospecha de neoplasia hepática. Su estudio citológico evidenció células malignas en el 80% de casos; no hubo falsos positivos. WASASTJERNA et al. (122) y, posteriormente LUNDQUIST et al. (123), demostraron la eficacia de dicha técnica para el diagnóstico de patologías difusas del hígado como la cirrosis,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

hepatitis crónica activa, hepatitis aguda y el hígado graso, estableciendo los distintos patrones citológicos, propios de cada patología. Posteriormente, DOMINIS et al. (124) y CARNEY et al. (125), publicaron sus series, en las que evidencian resultados similares.

También, a principio de los años 70, se hizo especial hincapié en el estudio de otros elementos formes, aparte de las células, que aparecían en los frotis biliares, tales como cristales de colesterol y gránulos de bilirrubina, para el diagnóstico de algunas alteraciones hepatobiliares y pancreáticas. Así, PROLLA y KIRSNER, en 1972 (126), observaron que en la cirrosis, pancreatitis, o el carcinoma pancreático, la bilis carecía de cristales de colesterol, habitualmente, que sin embargo, solían estar presentes en determinadas patologías biliares (colelitiasis, colecistitis...).

La importancia del papel diagnóstico de la citología biliar simple o exfoliativa, fue resaltada por WERTLAKE y DEL GUERCIO en 1976 (127). Estos autores realizaban colangiografía trashepática, a través de la que obtenían bilis para el análisis citológico, biopsia hepática y omento-portografía, para el estudio de disfunciones hepáticas. El examen citológico aportó el diagnóstico de carcinoma metastásico en dos de cinco pacientes.

La utilización de endoscopios flexibles dio paso a nuevos métodos de obtención de células. Fue posible lavar o cepillar la lesión bajo visión directa, lo que permitió obtener una cantidad limitada de material bien conservado y rico en células, que podía estudiarse rápidamente y con precisión. En 1977, HARADA et al. (128) obtienen muestras de bilis y jugo pancreático a través del sondaje de la papila, en la realización de una colangio-pancreatografía endoscópica retrógrada, en pacientes con sospecha de cáncer de cabeza de páncreas. El análisis citológico confirmó el diagnóstico de malignidad en algunas muestras. En el transcurso de los 10 últimos años, diversos estudios se han centrado en la citología exfoliativa de la bilis de los pacientes con ictericia obstructiva debida a una estenosis biliar (129, 130, 131). Las muestras, obtenidas por una ERCP o por el catéter de una punción transparietohepática, evidencian células malignas con una sensibilidad que oscila entre el 30 y 73%, según las series, pero con una especificidad muy próxima al 100%. La introducción del cepillado endobiliar, elevó la efectividad del examen citológico, consiguiendo una sensibilidad global del 70% y una especificidad del 100%, para la detección de malignidad (132, 133).

En la década de los 80, surge una nueva dimensión para la citología biliopancreática: el Trasplante Hepático y Pancreático. Con el trasplante aparecen nuevas patologías,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

fundamentalmente el rechazo, muchas veces de difícil diagnóstico. En la búsqueda de nuevos métodos dignósticos se recurre al examen citológico. Así, el análisis de las células que aparecían en los extensiones o frotis de jugo pancreático, sirvió para detectar, precozmente, episodios de rechazo y establecer rápidamente un correcto tratamiento (134, 135).

Dicha experiencia se aplicó en el Trasplante Hepático, constituyendo, el análisis citológico diario de la bilis, un método de monitorización de la función del nuevo hígado con enormes perspectivas (13, 136).

2.-TECNICAS GENERALES CITOLOGICAS

El estudio de las células del tubo digestivo tiene importantes aplicaciones diagnósticas. Para la realización del examen citológico se recurre a cuatro técnicas:

2.1.-Citología simple o exfoliativa.

Consiste en la recogida directa del fluido que se quiere analizar a través de una sonda, catéter o tubo de drenaje (tubo en "T" o de KEHR en el caso de la bilis), centrifugándolo inmediatamente y extendiendo el sedimento de forma uniforme sobre el portaobjetos, obteniendo las extensiones o frotis. Los frotis se fijan con alcohol al 95% y se tiñen con diversos métodos: Diff-Quik, Papanicolaou y Hematoxilina-Eosina, etc... Aunque la bilis preserva muy bien los elementos celulares, la recogida de la muestra no debe durar mas de 30 minutos, para evitar el deterioro y lisis celular (40, 136). Los frotis biliares se obtienen introduciendo la bilis en tubos cónicos de centrífuga (Cytospin) y, acoplados al portaobjetos, se centrifugan juntos. Ello permite una distribución muy homogénea de las células, previa a la tinción. Este método es el utilizado en el análisis citológico de la bilis de los pacientes trasplantados (13, 40, 136).

2.2. Citología de lavado.

El lavado consiste en irrigar la mucosa a estudiar con grandes cantidades de solución salina isotónica, examinándose después la muestra. Para mantener bien conservados los

UNIVERSIDAD DE MURCIA

elementos celulares, la muestra se recoge en un recipiente con hielo y se centrifuga rápidamente. Tras la decantación del líquido sobrenadante, se extiende el sedimento de manera uniforme sobre vidrios totalmente deslustrados o portaobjetos recubiertos con albúmina, para conseguir una mayor adherencia. Los frotis se fijan con alcohol al 95% y se tiñen y, a continuación, se examinan en el microscopio.

2.3.-Citología de cepillado.

La muestra de cepillado se obtiene bajo visión directa por medio de endoscopio de fibra óptica, por el que se introduce un cepillo que frota la zona a estudio. Para evitar la desecación, las células tienen que retirarse inmediatamente del cepillo, y se pasan a un porta (método directo) o bien, se introducen en suero isotónico y se procesa (método indirecto).

El frotis directo se prepara colocando el cepillo sobre un portaobjeto albuminizado, y por medio de un movimiento rotatorio rápido se presiona contra el porta.

El frotis indirecto se prepara introduciendo el cepillo en una botella de solución salina isotónica o de solución de Hanks, agitándolo enérgicamente para que se desprendan todas las células. Toda la muestra del líquido se filtra a través de una membrana porosa y se tiñe.

Con este método, guiando un cepillo específico por CPER, se ha logrado diagnosticar neoplasias de vías biliares y páncreas con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% (133).

2.4.- Biopsia-citología por aspiración (BCA) o Punción-aspiración con aguja fina (PAAF).

La biopsia con aguja fina se emplea cuando existen alteraciones visibles en técnicas de imagen (ECO, TAC,...) (137). También puede utilizarse para masas palpables o descubiertas en el curso de una laparoscopia o de una laparotomía, siendo especialmente útil en el diagnóstico de las lesiones focales y difusas de páncreas e hígado (121, 123). Ultimamente se ha empleado también en el diagnóstico de las alteraciones del hígado trasplantado, especialmente en el rechazo, con grandes resultados (45).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Para la realización de una biopsia percutánea, se introduce en la piel una aguja desechable de punción lumbar de calibre 22 ó una aguja de Chiba; se retira el obturador y se conecta a una jeringa desechable para aspirar. La muestra se extiende sobre un portaobjeto albuminizado y, con la ayuda de otro porta o de un aplicador, se prepara una película fina, se fija con alcohol al 95% y se tiñe. El citopatólogo puede realizar una técnica de tinción rápida y dar un diagnóstico inmediato (138).

3.-CITOLOGIA SIMPLE O EXFOLIATIVA DE LOS CONDUCTOS BILIARES. PATRON BILIAR NORMAL. EFECTOS DE LA INFLAMACION.

3.1.-Citología de la Bilis normal

La bilis, habitualmente, es un medio que preserva muy bien las células. La población celular normal consiste en unas pocas células epiteliales separadas, o formando láminas de células cohesionadas en una sola capa o plegadas, cuboides o columnares con superficie plana. Poseen un tamaño uniforme, de unas 30 micras. Su citoplasma es débilmente opaco, algunas veces vacuolado, acidofílico o cianofílico. El núcleo granular, contiene un nucléolo pequeño, oval, situado paracentralmente, hacia la parte basal de la célula. También pueden aparecer células epiteliales con forma de copa. Las células exfoliadas de los conductos biliares y pancreáticos son iguales.

En algunos frotis es posible encontrar algún hepatocito, aunque el método para obtenerlos es la realización de una BCA (biopsia-citología por aspiración con aguja fina). En un individuo sin patología, se evidencia como una célula poligonal de unas 25 micras de diámetro, con un núcleo redondo que posee un nucléolo pequeño muy remarcado; la cromatina nuclear está regularmente distribuida, finamente granular o fibrilar. El citoplasma, de color grisáceo, presenta gránulos de pigmento verde claro y oscuro, y vacuolas pequeñas.
Los frotis suelen presentar en su fondo gránulos de bilirrubinato.

Es frecuente encontrar, junto a las células epiteliales, leucocitos PMN, sin significado patológico (59, 139).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

3.2.-Citología Biliar en la Coledocolitiasis. Efectos de la Inflamación

La inflamación de la vía biliar, causada por obstrucción, infección, exploración instrumental reciente o la presencia de cálculos, aumenta el número de células epiteliales en bilis (139). Estas células, en estas circunstancias, pueden experimentar cambios morfológicos no malignos, tales como hiperplasia, alteraciones degenerativas o regenerativas. Los signos citológicos producidos por una inflamación incluyen la pérdida de las estructuras de superficie, vacuolización citoplasmática, crecimiento del núcleo, hipercromatismo grosero, multinucleación y multinucleolización. La muerte celular está indicada por la destrucción nuclear (picnosis, cariolisis y cariorrexis), y la vacuolización citoplasmática (59). En procesos inflamatorios, la bilis puede contener además de células epiteliales normales y anormales, leucocitos (que en ocasiones pueden ser el tipo celular predominante), sangre, levaduras y bacterias (sobre todo en episodios de colangitis aguda). Cuando la inflamación afecta al parénquima hepático, pueden aparecer en la bilis hepatocitos alterados y varios tipos de células inflamatorias, en función del tipo de infiltrado que afecte a los conductillos biliares. Las alteraciones hepatocitárias consisten en anisocitosis, anisonucleosis, degeneración de la cromatina nuclear (agregación de la misma en forma de gránulos o bandas adosadas a la membrana nuclear; vacuolización); a nivel citoplasmático, se observa una pérdida de los gránulos verde claro, y numerosas vacuolas irregulares. Las células inflamatorias que pueden aparecer en estos frotis varían según el tipo de infiltrado parenquimatoso. En los procesos agudos predominan los leucocitos PMN, mientras que en los crónicos es factible encontrar linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (124, 139, 140).

4.-LA CITOLOGIA BILIAR EXFOLIATIVA EN EL DIAGNOSTICO DE LAS COMPLICACIONES DEL PACIENTE CON TRASPLANTE ORTOTOPICO DE HIGADO.

4.1.-Citología y trasplante. Antecedentes y actualidad.

La primera evidencia de la eficacia de la citología exfoliativa en el diagnóstico de las alteraciones del injerto pancreático, fue dada en 1987 por STEINER et al. (141). Estos autores

UNIVERSIDAD DE MURCIA

demostraron que el estudio citológico del jugo pancreático, permitía el diagnóstico precoz de los episodios de rechazo del páncreas trasplantado en humanos. El injerto se anastomosó al intestino, derivando, mediante una sonda o catéter, temporalmente, la secreción del mismo. Ello les permitía obtener muestras diarias de jugo pancreático y medir el flujo drenado, concentración de amilasa, y el número y tipos de células, que en el mismo había. Para la obtención de las células, extraían 5 ml de jugo pancreático, y lo centrifugaban durante 5 minutos a 1000 r.p.m.; tomaban 100 microlitros del sedimento y lo extendían en los portaobjetos, siendo teñidos por el método May-Gründwald-Giemsa. Observaron que en el jugo pancreático de los pacientes trasplantados que evolucionaban favorablemente, durante los 3-4 primeros días, aparecían abundantes células inflamatorias (polimorfonucleares, en su totalidad), que a partir del 5° día postoperatorio, desaparecían; los niveles de amilasas en el mismo eran normales. Cuando surgía un episodio de rechazo, aparecían linfocitos en más del 5% de las células y un descenso en los niveles de amilasas, siendo marcadores mas sensibles que los de función endocrina (glucosa y amilasa sérica) para el diagnóstico del mismo.

TYDEN et al. (140), basándose en las aportaciones anteriores, publican pocos meses después su experiencia en el diagnóstico precoz del rechazo, en 15 pacientes con trasplante ortotópico de páncreas (TOP). Monitorizaron los pacientes, determinando los niveles de glucosa y amilasa en suero; midieron, diariamente, el flujo pacreático drenado por el catéter de derivación externa, los niveles de amilasa y determinaron el número y tipos celulares, del mismo modo que STEINER. Evidenciaron que, en los episodios de rechazo, el signo más precoz era el aumento súbito de la celularidad, a expensas, fundamentalmente, de monocitos, linfocitos y linfoblastos; uno o dos días después, descendía la concentración de amilasa en el jugo pancreático. La monitorización de la amilasa en suero y los test de función endocrina pancreática, se revelaron poco útiles.

REINHOLT et al. (134), en 1988, estudiaron la citología del jugo pancreático, como método para el diagnóstico precoz del rechazo del injerto, en 20 pacientes con TOP. El injerto se situó intraperitoneal, anastomosado a un asa de yeyuno en "Y" de ROUX, a través de la que se colocaba, temporalmente, un catéter en el conducto de WIRSUNG, por el que se extraían, diariamente, dos muestras de jugo pancreático; una para determinación de amilasas; la otra para análisis citológico, determinando densidad (n° de células por extensión) y composición celular (porcentaje de los distintos tipos celulares). Observaron que las muestras de los 3-5 primeros

UNIVERSIDAD DE MURCIA

días eran moderada o escasamente celulares, con predominio de polimorfonucleares, para hacerse acelulares a partir de la primera semana postoperatoria. Once pacientes sufrieron algún episodio de rechazo, en los que se detectó un súbito aumento de la celularidad a expensas de mononucleares (más del 10%) y aparición de linfo y/o monoblastos (al menos 2 por espécimen). Estos pacientes presentaron marcada disminución de los niveles de amilasas en jugo pancreático, pero 1-2 días después que las alteraciones citológicas. Por tanto, demostraron la eficacia de la monitorización citológica del jugo pancreático, como método sencillo, rápido y fiable para el diagnóstico precoz del rechazo en el TOH.

En 1989, REINHOLT y KUBOTA (143), basándose en sus aportaciones en citología en el TOP (134, 135), introducen, por primera vez, el análisis citológico de la bilis como método útil para el diagnóstico de las alteraciones del hígado trasplantado, fundamentalmente el rechazo. Para ello utilizan el mismo método de obtención, tinción y contaje celular que en el jugo pancreático. Es un hecho conocido que, en las biopsias hepáticas durante los episodios de rechazo agudo, el principal hallazgo es la destrucción del epitelio de los conductos biliares por células inmunoactivadas e inflamatorias (42, 43, 44), por lo que si esta celularidad apareciese en la bilis del paciente, podría ser considerada como marcador del rechazo.

Su método consiste en la extracción diaria de bilis del tubo de KEHR, depositando 5 gotas en un tubo cónico de centrífuga que contiene 5 ml de medio de cultivo (constituido por RPMI, Flow Laboratories, U.K. y seroalbúmina humana al 1%) y se sedimenta a 200xg durante 10 minutos. El material obtenido se suspende en 0.5 ml del medio y se centrifuga sobre los portaobjetos a 500 r.p.m. durante 8 minutos. Las extensiones obtenidas se tiñen según el método May-Grünwald-Giemsa y se examinan al microscopio de luz, contando el nº total de células y porcentaje de los distintos tipos celulares.

KUBOTA et al. (13), en 1989, demuestran la utilidad del análisis citológico biliar para diagnosticar los episodios de rechazo agudo, en 21 trasplantes de hígado, comparando su eficacia con la de la biopsia con aguja fina (PAAF) y biopsia con aguja gruesa. Obtiene 307 espécimenes, estudiando la densidad y composición celular en 130. En los 3-5 primeros días postoperatorios la bilis es rica en células, predominando las células fantasma (células de morfología degenerada, no clasificable en ningún otro grupo, aunque probablemente, de origen epitelial), moderado porcentaje de PMN y MN, y, ocasionalmente, células epiteliales. A partir del 5º día, decrece la celularidad. Cuando aparece un episodio de rechazo, la bilis se hace,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

súbitamente, muy celular, con predominio de PMN (mas del 50%, en ausencia de gérmenes) y/o alto porcentaje de macrófagos y MN (incluidos linfocitos) y/o presencia de BLASTOS (linfoblastos, monoblastos, células plasmáticas con trasformación blástica). Estos últimos son el dato más específico, si bien aparecen tardíamente. Al iniciar el tratamiento antirrechazo, la celularidad decrece rápidamente. Al comparar la citología con la PAAF, encuentran alta correlación cuando el rechazo cursa con deterioro moderado-importante de la función hepática (80% de extensiones con muy alta celularidad). Con respecto a la biopsia, no encuentra una clara correlación entre la densidad celular en bilis y el grado de infiltración celular de los conductos biliares, si bien, en los rechazos severos suelen aparecer espécimenes con alta celularidad.

Estos autores, en 1990 (140, 144), evalúan de nuevo el papel de la citología biliar en 32 trasplantes de hígado, confirmando su utilidad para el diagnóstico del rechazo, aunque sus limitaciones lo convierten en un método diagnóstico adicional y no único.

DIETZE et al. (145), en ese mismo año, estudian la citología del rechazo en el páncreas de rata, comparándola con la del hígado. Observa que en el páncreas se afecta, inicialmente, el epitelio acinar y después los conductos interlobulares grandes. El tejido conectivo que envuelve los acinis está muy vascularizado y tiene pocas fibras colágenas, lo que permite a los linfocitos activarse e invadir fácilmente el epitelio acinar, por lo que en el jugo pancreático aparecerán, precozmente, dichas células, algunas de ellas con trasformación blástica. En el rechazo hepático, el daño se produce fundamentalmente en los conductos biliares y en el endotelio vascular, rodeados de tejido conectivo que dificulta el paso de células linfoides, pero que los PMN van a atravesar en virtud de su movilidad ameboidea. Por ello, inicialmente, aparecerán dichas células, junto a las epiteliales dañadas, en la bilis, no encontrando células mononucleares ni blastos; si se mantiene el rechazo varios días, el infiltrado se torna mononuclear, apareciendo blastos tardíamente.

En sus estudios de citología biliar realizados en 32 trasplantes ortotópicos de hígado en humanos, durante los episodios de rechazo, encontraron elevación súbita de los PMN en las extensiones, pero en la mayoría de casos no se detectó un patrón uniforme de células inflamatorias, a diferencia del rechazo pancreático, confiriéndole poco valor diagnóstico.

Por otra parte, OLDHAFER et al. (136) publicaron en 1990 su experiencia en el diagnóstico de las alteraciones del hígado trasplantado mediante citología biliar exfoliativa,

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

demostrando su gran utilidad. Compararon los hallazgos citológicos con el curso clínico, de forma retrospectiva, obteniendo 270 espécimenes o extensiones. En los primeros días del postoperatorio, las extensiones eran muy celulares, con un pico máximo al día 3° (114.000 células/ml), estando constituidos por PMN, provenientes del proceso inflamatorio que acompaña a la isquemia del injerto durante la intervención. Posteriormente, las extensiones se hacen acelulares. Cuando apareció un episodio de rechazo se elevó súbitamente la celularidad, con importante aumento de linfocitos, células mononucleadas y células epiteliales (hepatobiliares). En los casos de trombosis arterial, la celularidad aumentó a expensas de células epiteliales biliares, más sensibles a la isquemia arterial. Los episodios de colangitis cursaron con aumento de los PMN, como en los primeros días postoperatorios, siendo el cultivo quien dio el diagnostico definitivo.

KUBOTA Y ERICZON, en 1992 (146), estudiaron la correlación entre los hallazgos citológicos en bilis y los anatomopatológicos por biopsia hepática, en 23 trasplantes de hígado. Encontraron que la citología biliar detectaba el rechazo con una sensibilidad del 58% y lo excluía con una especificidad del 75%. El hecho de que apareciesen extensiones acelulares en algunos episodios de rechazo, se explicaría por dos motivos: por un lado, al disminuir el flujo biliar, se "lavarían" menos células de los conductos biliares; por otro lado, la relativa larga distancia entre las triadas portales y el final del tubo de KEHR, facilita el deterioro y lisis celular. Por otra parte, la existencia de extensiones muy celulares sin detectarse rechazo anatomopatológicamente, se debería a episodios de colangitis o isquemia del injerto durante la intervención. No encontraron correlación entre la densidad celular en bilis y el grado de infiltración en las triadas portales. Aunque observaron que la densidad celular tendía a aumentar con el porcentaje de conductos biliares atacados por las células inmunoactivadas, no se demostró correlación lineal.

ROBERTI et al., en 1992 (40), evaluaron la eficacia diagnóstica de la citología biliar. Extraían bilis (10 ml) del tubo de KEHR, diariamente durante la primera semana, a días alternos durante la segunda y semanalmente hasta el 3° mes postoperatorio. La bilis obtenida, inmediatamente, era centrifugada a 500xg durante 5 minutos y teñida con el método Diff Quik, examinándose al microscopio de luz. En las extensiones con más de 10 células se calculaba el n° total de células (densidad celular) y porcentaje de cada tipo celular (composición celular), distinguiendo sólo dos tipos: **células epiteliales (CE),** procedentes de los conductos biliares

UNIVERSIDAD DE MURCIA

dañados, y **células inflamatorias (CI)**, fundamentalmente PMN, linfocitos y monocitos. Observaron que el 70% de los episodios de rechazo ocurrieron en las dos primeras semanas. Encontraron extensiones con alta celularidad a expensas de CI el primer día postoperatorio, decreciendo posteriormente, siendo acelulares a partir del 3°-4° día, atribuido a la isquemia peroperatoria del injerto. No encuentran células fantasma pues utilizan bilis fresca (preserva bien las células) para el análisis, hecho importante referido, anteriormente, por OLDHAFER et al. (136). En los episodios de rechazo se elevó precoz y súbitamente la celularidad con predominio de CI, apareciendo, ocasionalmente, BLASTOS. Cuando el tratamiento antirrechazo fue efectivo, a partir del 2°día, disminuyó la celularidad. Obtuvieron una sensibilidad y especificidad por encima del 90%, considerándolo un método muy útil para monitorizar la evolución del injerto hepático.

4.2.-Otros patrones citológicos

Además de los patrones celulares descritos para el rechazo, también se han evidenciado otros en las diversas complicaciones que puede sufrir el injerto.

4.2.1.-ISQUEMIA ARTERIAL DEL INJERTO.

La isquemia del injerto va a incidir, sobre todo, en las células más sensibles, que son las epiteliales de los conductos biliares. Así, OLDHAFER et al. (136) evidencian, en las extensiones obtenidas en dicha situación, alta celularidad, con más de un 80% de células epiteliales. KUBOTA et al. (13, 144) obtienen un predominio (70%) de "células fantasma" (de probable origen epitelial); el resto lo constituyen células epiteliales y leucocitos PMN (fruto del proceso inflamatorio acompañante). ROBERTI et al. (40) demuestran, en la mayoría de las extensiones, la presencia de células inflamatorias, aunque en menor porcentaje que las epiteliales; no objetivan células fantasma (consideran a dichas células como un artefacto, fruto de la no utilización de bilis fresca para la tinción).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

4.2.2.-COLANGITIS.

En algunos casos de colangitis severa, puede elevarse la celularidad, a expensas de PMN. En estos casos, no se han detectado células con transformación blástica, y se suelen observar bacterias u hongos en las extensiones (13).

4.2.3.-SEPSIS.

ROBERTI et al. (40) objetivaron aumento de la celularidad en situaciones de sepsis con afectación de la función hepática. Aparecen predominantemente células inflamatorias, sin blastos, siendo necesarios los signos clínicos y el cultivo para el diagnóstico definitivo.

5.-BIOPSIA HEPATICA EN EL TOH. BASES HISTOPATOLOGICAS DE LAS COMPLICACIONES DEL INJERTO.

5.1.-Histopatología del Rechazo

El primer signo de rechazo, en animales no inmunosuprimidos o en receptores humanos, es la aparición en el hígado de células linfoides que abandonan las ramificaciones de la vena porta y las pequeñas ramas arteriales de todo el injerto, se acumulan en las vías portales y penetran en la vena central y en el revestimiento endotelial de los sinusoides. Las células invaden el espacio de Disse e incluso se insinúan entre los hepatocitos. Con el infiltrado celular, se desintegran muchos sinusoides, disminuye el flujo sanguíneo a través del injerto y mueren algunas células centrolobulillares (147). La necrosis centrolobulillar se convierte posteriormente en necrosis de zonas intermedias, y comienza a deteriorarse la función hepática. En esta fase avanzada, pueden encontrarse inmunoglobulinas y complemento en la pared arteriolar y desarrollar necrosis fibrinoide (148).

SNOVER, en 1984 (43, 44), estableció la triada diagnóstica del rechazo y lo clasificó en 4 grados de severidad. La triada consiste en la presencia de **infiltrado inflamatorio celular mixto** (linfocitos y monocitos, incluidas células con trasformación blástica, histiocitos, eosinófilos, y células plasmáticas) que afecta a los **conductos biliares** de la triada portal, **lesión**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

de los mismos, y **cambios vasculares, fundamentalmente endotelialitis** de las venas centrales y portales. Según la extensión de dichas lesiones estableció 4 grados histopatológicos de rechazo agudo:

> **Grado 0**: Injerto con menos del 50% de conductos biliares atacados por el infiltrado inflamatorio, sin evidencia de endotelialitis.
>
> **Grado 1**: Injerto con infiltración de menos del 50% de conductos biliares, con endotelialitis.
>
> **Grado 2:** Más del 50% de conductos biliares atacados.
>
> **Grado 3**: Más del 50% de conductos atacados, y presencia de arteritis, escasez de conductos biliares, o balonización central con desaparición confluente de hepatocitos.

La **lesión de los conductos biliares** es el hallazgo que reviste más importancia (42, 44), por ser más precoz y sensible que la endotelialitis, y estar estrechamente relacionado con la severidad del rechazo, aunque no es un marcador absoluto del rechazo, debiendo considerarlo en relación con los otros elementos de la triada y con los cambios parenquimatosos.

Las características histológicas de la lesión de los conductos biliares varían con el estadío evolutivo del episodio de rechazo. Así, VIERLING y FENNELL (149) evidenciaron que, en los momentos iniciales, el infiltrado, predominantemente mononuclear, se limitaba al epitelio del conducto; posteriormente, aparecía pleomorfismo en las células epiteliales, con picnosis, cariorrexis y oscurecimiento del citoplasma, permaneciendo intacta la pared del conducto; finalmente, el infiltrado se hace mixto y se destruye la pared del conducto.

5.2.-Histopatología de otras complicaciones

5.2.1.-ISQUEMIA ARTERIAL.

El hallazgo histológico más característico en la obstrucción de la arteria hepática es la necrosis centrolobulillar. Las células ductales, muy sensibles a la isquemia, sufren edematización y necrosis, descamándose de los conductos biliares (136, 146). El infiltrado inflamatorio acompañante no es muy evidente, y en él predominan los leucocitos PMN. Las lesiones

UNIVERSIDAD DE MURCIA

isquémico-necróticas hepáticas pueden ser colonizadas con rapidez por gérmenes gram negativos, provocando un estado séptico fatal para el paciente (22).

5.2.2.-SHOCK.

La insuficiencia circulatoria periférica del shock, cuando se prolonga suficientemente y es intensa, causa lesiones hepáticas. Estas varían desde pequeños cambios grasos centrolobulillares en las células hepáticas, hasta la necrosis hipóxica. En la mayor parte de los casos de shock el trastorno funcional del hígado es muy poco o nulo. Los cambios morfológicos son reversibles; la regeneración es la norma y, posteriormente, no suele haber secuelas (22).

5.2.3.-TROMBOSIS VENOSA.

La **trombosis venosa suprahepática** produce, en un estadío inicial, congestión y necrosis centrolobulillar que, en casos graves, puede conectar a modo de puente las áreas centrales de lobulillos adyacentes; la reacción inflamatoria acompañante suele ser escasa. Algunos autores han advertido abundantes eritrocitos en los espacios de Disse y en las trabéculas hepáticas, con sinusoides relativamente vacíos, considerando que estos hallazgos son característicos de la obstrucción venosa suprahepática (150). En estadíos avanzados, se puede observar fibrosis central y nódulos regenerativos periportales.

En la **trombosis portal** se pueden observar los *infartos de Zahn*, que son áreas circunscritas de color rojo oscuro en las superficies de corte del hígado. A pesar de su denominación, no son infartos verdaderos pues no hay necrosis, y sólo se advierten, al examen histológico, atrofia hepatocelular y congestión sinusoidal.

5.2.4.-COLANGITIS.

Se caracteriza por la presencia de conductos biliares distendidos, que contienen bilis con abundantes gérmenes y leucocitos PMN y, en las formas supuradas, pus. Invariablemente, se

UNIVERSIDAD DE MURCIA

advierte infiltrado inflamatorio en los conductos biliares y en los tejidos que rodean a las vías portales, a expensas, fundamentalmente, de PMN (13, 151).

5.2.5.-SEPSIS.

La sepsis puede afectar al hígado, ocasionando un cuadro de colestasis intrahepática, histológicamente caracterizado por la presencia de bilis espesa en los conductillos, a veces formando tapones, particularmente en la zona centrilobulillar, donde el flujo de bilis es mínimo. El pigmento biliar es visible en los hepatocitos y, después, en las células de Kuppfer y los monocitos. Se puede observar la degeneración *"en pluma"* del hepatocito (hepatocitos tumefactos con flecos de citoplasma pardusco separados por áreas pálidas). En los casos graves, puede producirse necrosis focal acompañada de reacción inflamatoria local, con aparición de células inflamatorias en bilis, afectación de las vías portales, proliferación de los conductillos biliares y fibrosis (40, 151).

5.2.6.-FALLO PRIMARIO DEL INJERTO.

Aunque la histología del hígado con disfunción o fallo primario puede no reflejar ningún hallazgo, es frecuente encontrar zonas de necrosis isquémica, generalmente localizada en las zonas subcapsulares, con preservación de la arquitectura hepática restante. Histológicamente, la lesión característica es la necrosis focal (22).

UNIVERSIDAD DE MURCIA DOCTORADO COMISIÓN GENERAL

UNIVERSIDAD DE MURCIA

II.-MATERIAL Y METODO

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

MATERIAL

1-PACIENTES

1.1.-Selección de pacientes.

Para la realización de esta tesis se han estudiado **40 pacientes** portadores de un tubo de drenaje de látex en la vía biliar principal (tubo en "T" o de KEHR), que cumplían los criterios de selección que se detallan más adelante en este capítulo.

Los pacientes se distribuyeron de la siguiente forma:

A) Grupo Control:

Constituido por **15 pacientes**, 12 mujeres y 3 varones, con edades comprendidas entre 18 y 68 años, con una media de 48.53 +/- 12 años, intervenidos por coledocolitiasis, en los que se ha practicado colecistectomía, por vía laparotómica, apertura longitudinal del colédoco, para su exploración y extracción de cálculos, y cierre sobre un tubo de drenaje biliar en "T" o de KEHR. Este es conectado a un medidor horario de diuresis que, a su vez, drena en un sistema de bolsa cerrado y se retira a los 12 días de la intervención. Los datos relativos a la función hepática (perfil hepático) previos a la intervención, así como durante el postoperatorio inmediato (12 primeros días) vienen referidos en la tabla I.

Se excluyeron los pacientes que presentaron cualquier proceso inflamatorio o neoplásico del hígado y/o de la vía biliar, que pudiese interferir en el patrón bioquímico y citológico de la bilis, tales como colecistitis aguda, colangitis y neoplasias de hígado, páncreas, vesícula y vía biliar.

B) Grupo Trasplante:

Constituido por **25 pacientes**, 19 varones y 6 mujeres, con edades comprendidas entre 22 y 62 años, con una media de 44.94 +/-14 años, en los que se han realizado 29 Trasplantes Ortotópicos de Hígado (TOH), con colecistectomía y anastomosis colédoco-coledociana

UNIVERSIDAD DE MURCIA

término-terminal, dejando un tubo de drenaje biliar, de las mismas características que en el grupo control, en el colédoco, que sobrepasa la anastomosis y se extrae a nivel del colédoco del receptor a través de una incisión independiente. Durante los primeros 18 días del postoperatorio, dicho tubo permanece abierto, conectado a un sistema como el del grupo control. Si no surgen complicaciones, el día 18° del postoperatorio, se pinza el tubo y se retira el sistema (el tubo de Kehr permanecerá pinzado hasta su retirada tres meses después). Al igual que en el grupo control, los datos relativos a la función hepática (desde el día previo al de la intervención hasta el día 18° del postoperatorio), vienen referidos en la tabla V.

Las indicaciones del trasplante fueron:

*** Cirrosis etílica**	**14 pacientes**
*** Cirrosis postnecrótica (VHB y VHC)**	**5 pacientes**
*** Hepatitis fulminante**	**2 pacientes**
*** Enfermedad de Corino-Andrade**	**2 pacientes**
*** Hepatocarcinoma (sin cirrosis)**	**1 paciente**
*** Enfermedad de Wilson**	**1 paciente**
*** Retrasplante (Fallo primario)**	**4 pacientes**

Este grupo se ha dividido en 4 subgrupos, en función de la evolución clínica de los pacientes, que a continuación se detallan.

1.2.-Patrones clínico-analíticos en la evolución postoperatoria de los pacientes trasplantados.

Basándonos en criterios **clínicos** (signos, síntomas y datos de exploraciones complementarias) y **analíticos** (hemograma, coagulación, ionograma y perfil sérico hepático) establecemos los patrones evolutivos de normalidad y patológicos. Estos patrones son:

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1.2.1.-EVOLUCION NORMAL.

Constituido por **16 pacientes** (incluidos los 4 retrasplantes) que, tras la intervención, reunieron los siguientes criterios:

A)Criterios clínicos:

-**Constantes físicas** (TA, pulso y Tª) dentro de los límites normales.

-**Secreción biliar**: volumen diario por encima de 300 ml, con bilis de color verde-amarillo intenso, densa y filante.

-**Eco-Doppler** hepática sin hallazgos patológicos.

B)Criterios analíticos:

-**Hemograma** con recuento y fórmula dentro de los límites normales considerados por nuestro laboratorio.

-**Pruebas de coagulación**, incluida la actividad de protrombina, dentro de los límites normales considerados por nuestro laboratorio (Tabla V).

-**Bioquímica sérica (perfil hepático)** dentro de los límites normales considerados por nuestro laboratorio (Tabla V).

-**Cultivos** de fluidos orgánicos negativos.

1.2.2.-FALLO O DISFUNCION PRIMARIA DEL INJERTO .

Constituido por **4 pacientes**. Se consideró este patrón patológico cuando, tras la intervención, el paciente reunió los siguientes criterios:

A)Criterios clínicos:

Al menos, presentó:

-**Constantes físicas** alteradas con aparición de algunos de los siguientes síntomas o signos:

UNIVERSIDAD DE MURCIA

* Hipotensión, taquicardia.

* Fallo renal: oliguria, anuria.

* Ileo intestinal

* Insuficiencia respiratoria aguda, precisando ventilación asistida prolongada.

* Edema cerebral: obnubilación, irritabilidad, coma.

* En estadíos avanzados, fallo multiorgánico.

-Secreción biliar anormal:

* Volumen diario por debajo de los 100 ml.

* Bilis de color verde pálido, muy fluida y poco filante.

-Eco-Doppler sin evidencia de alteraciones morfológicas y con conservación del flujo sanguíneo.

B)Criterios analíticos:

-Acidosis metabólica.

Perfil analítico hepático alterado (tabla VI), evidenciado por:

-Pruebas de coagulación alteradas, con una **actividad de protrombina** que no supera el 20% del valor preoperatorio.

-Niveles en suero de **transaminasas (GOT** y **GPT)** por encima de 3000 UI/l y niveles progresivamente elevados de **bilirrubina**.

-Cultivos de fluidos orgánicos negativos.

C)Criterios anatomopatológicos:

Si se realiza biopsia hepática, en el fallo primario puede observarse un parénquima con focos de necrosis subcapsular y conservación de la arquitectura restante. Ocasionalmente ningún hallazgo específico.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1.2.3.-EVOLUCION CON EPISODIO DE RECHAZO AGUDO.

Constituido por **6 pacientes** que presentaron, globalmente, 7 episodios de rechazo (3 episodios durante el periodo comprendido entre el 6° y 12° día postoperatorio y 4 entre los días 13° y 18°). Se consideró episodio de rechazo cuando el paciente reunió los siguientes criterios:

A)Criterios clínicos:

-Constantes físicas alteradas con aparición de algunos de los siguientes síntomas y signos:

* Fiebre.
* Astenia y anorexia marcadas.
* Obnubilación.
* Dolor o hipersensibilidad en hipocondrio derecho.

-Secreción biliar alterada:

* Disminución súbita del volumen biliar diario secretado respecto a los días previos de referencia.
* Bilis de color más claro, menos densa y filante que los días previos.

-Eco-Doppler hepática sin evidencia de alteraciones morfológicas ni del flujo sanguíneo.

B)Criterios analíticos:

-Hemograma:

* Leucocitosis.
* Neutrofilia y eosinofilia.

-Pruebas de coagulación alteradas con caída súbita de la **actividad de protrombina** respecto a los valores previos de referencia (tabla VI).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-Elevación súbita de la **bilirrubina total** (sobre todo la fracción **directa**) y de los **enzimas hepáticos** (tabla VI).

-**Cultivos** de fluidos orgánicos negativos.

C)Criterios anatomopatológicos:

Cuando el paciente reunió los criterios clínicos y analíticos mencionados, se indicó la realización de biopsia del injerto, mediante punción con aguja gruesa (TRU-CUT), y estudio anatomopatológico del espécimen.

Se consideró el diagnóstico de rechazo, siguiendo los criterios de **SNOVER** (43, 44), cuando se manifestó la **triada** siguiente:

-Lesión de los conductos biliares.

-Infiltrado mixto (polinuclear y mononuclear) portal.

-Endotelitis venosa.

1.2.4.-EVOLUCION CON EPISODIO DE SEPSIS.

Este patrón está constituido por **3 pacientes** que, globalmente presentaron 3 episodios de sepsis, todos ellos entre el 6° y el 12° día postoperatorio. Reunieron los siguientes criterios:

A)Criterios clínicos:

-**Constantes físicas alteradas**:

* Fiebre.

* Astenia y anorexia.

* Tendencia al shock: hipotensión y oligoanuria con PVC baja.

* Ictericia.

-**Eco-Doppler hepática**: No alteraciones morfológicas ni del flujo sanguíneo. Si el origen de la sepsis es una colangitis, la dilatación de las vías biliares junto a un aumento en la ecogenicidad de su contenido, puede sugerir su diagnóstico.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

B)Criterios analíticos:

-**Hemograma**:

* Leucocitosis.

* Neutrofilia.

-**Pruebas de coagulación** con alguna alteración, pero la actividad de protrombina suele mantenerse en los niveles previos de referencia (tabla VI).

-**Bioquímica sérica**: Elevación de los marcadores de colestasis, fundamentalmente bilirrubina directa y fosfatasa alcalina (tabla VI).

-**Cultivos de fluidos orgánicos positivos**: Establecen el diagnóstico definitivo.

2-MATERIAL PARA EL ESTUDIO DE LA BIOQUIMICA BILIAR (LIPIDOS BILIARES)

2.1.-Material fungible.

-Tubos secos de cristal estériles Monoject^{R} (Sherwood) Medical.

-Pipetas.

-Cubetas de espectrofotometría.

-Tubos cónicos de centrífuga (Trimex).

2.2.-Reactivos y soluciones.

2.2.1.-EXTRACCCION DE LIPIDOS

-Cloroformo (Merck 2445).

-Metanol (Panreac 131091).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2.2.2.-DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS

*Reactivos

-Fosfato disódico (Merck 6586).
-Molibdato amónico (Probus 21220).
-1-amino-2-naftol-4-sulfónico (Sigma A-0505).
-Metabisulfito sódico (Panreac 141698).
-Sulfito sódico anhidro (Sigma S-0505).
-Acido perclórico (Merck 519).

*Soluciones

-Solución patrón de fósforo 10 microgramos/ml.
-Solución de molibdato amónico 5%.
-Reactivo Fiske-Subarrow: 0.1 g de 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 6 g de metabisulfito sódico y 0.6 g de sulfito sódico anhidro en 50 ml de agua.

2.2.3.-DETERMINACION DE COLESTEROL

*Reactivos

-Colesterol (Sigma C-3137).
-Cloruro férrico (Merck 803945).
-Acido ortofosfórico (Merck 573).
-Acido sulfúrico (Merck 731).
-Acido acético glacial (Probus 010520).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

*Soluciones

-Solución reactiva **a**: 2.5 g de cloruro férrico y 100 ml de ácido ortofosfórico.

-Solución reactiva **b**: 4 ml de solución reactiva **a** y 50 ml de ácido sulfúrico.

-Solución standard de colesterol 0.1 mg/ml en ácido acético.

2.2.4.-DETERMINACION DE ACIDOS BILIARES

-Kit Sterognost 3-alpha Pho NYCOMED PHARMA^{R}, AS (Oslo-Norway).

3.-MATERIAL PARA EL ESTUDIO DE LA CITOLOGIA BILIAR

3.1.-Material fungible.

-Porta-objetos 76 x 26 mm/3 x1 inch Menzel-Glaser^{R}.

-Tubos secos de cristal estériles Monoject^{R} (Sherwood) Medical.

-Filtros de centrifugadora para portaobjetos Shandon^{R}.

3.2.-Reactivos y soluciones.

3.2.1.-TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.

*Reactivos

-Eosina (Sigma HT 110-1-16).

-Hematoxilina (Sigma GHS 1-16).

-Alumbre potásico (Merck 2523).

-Acido cítrico (Merck 244).

-Yodato potásico (Sigma P 8269).

-Hidrato de cloral (Merck 2425).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-Agua destilada.

*Soluciones

-Solución de eosina: 5 g de eosina y 1l de agua destilada.
-Solución de hematoxilina: 1 g de hematoxilina, 50 g de alumbre potásico, 0.2 g de yodato potásico, 50 g de hidrato de cloral y 1 l de agua destilada.

3.2.2.-TINCION DIFF-QUICK

*Soluciones

-Solución tamponada de xanteno (QUICK PANOPTIC Nr. 2^{R}, QCA).
-Solución tamponada de tiazina (QUICK PANOPTIC Nr. 3^{R}, QCA).

3.2.3.-TINCION DE PAPANICOLAOU

*Reactivos

-Alcohol etílico 96° (Merck 971).
-Xilol 100% (Sigma X 6625).

*Soluciones

-Solución de hematoxilina.
-Solución Papanicolaou Stain Orange G. 6.^{R} (Merck).
-Solución Papanicolaou Stain Eosina Alcoholic. 36.^{R} (Merck).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

4.-APARATOS DE MEDIDA

4.1.-Aparatos para determinación de lípidos biliares

-Sistema de calentado Tecator (Selecta).

-Sistema de calentado Precister (Selecta).

-Centrífuga refrigerada TJ-6 (Beckman).

-Espectrofotómetro Du-40 (Beckman).

4.2.-Aparatos para el estudio citológico

-Centrifugadora CYTOSPYN^{R} 2, Shandon, U.K.

-Microscopio óptico NIKON^{R} 119.

METODO

1.-DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS

1.1.-Control clínico y analítico de los pacientes:

Todos los enfermos se controlaron clínica y analíticamente, desde el día previo a la intervención hasta el día en que se clampó o retiró el tubo de KEHR (**día 12º** del postoperatorio en el grupo control y **día 18º** en el grupo de pacientes trasplantados). Cada día, se realizó:

-**Exploración física** detallada del paciente, anotando todas las constantes: TA, pulso y Tª.

-**Analítica completa**, incluyendo hemograma, test de coagulación y bioquímica sérica completa o perfil hepático (colesterol, GOT, GPT, fosfatasa alcalina, GGT, bilirrubina total y bilirrubina directa).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

-**Control de la secreción biliar**, anotando el volumen diario de bilis y las características físicas de la misma (color, densidad y filancia).

Ocasionalmente se realizaron:

-**Hemocultivos**: En los pacientes trasplantados con sospecha clínica de sepsis.

-**Cultivo de bilis**: En aquellos con sospecha de colangitis.

-**Ecografía-Doppler hepática**: Para comprobar la homogeneidad del parénquima hepático y la indemnidad de las anastomosis venosas y arterial.

1.2.-Control Citológico y Bioquímico de la bilis

Diariamente, durante los 12 primeros días del postoperatorio en el grupo control y los 18 primeros días en el grupo trasplante, se medía la cantidad total de bilis drenada por el tubo en "T" de KEHR (ml/24 h.), y se extraían dos muestras de bilis directamente del tubo. Una se enviaba al laboratorio de Micrométodos para realizar el análisis bioquímico biliar, con el fin de determinar la concentración de **COLESTEROL, FOSFOLIPIDOS y ACIDOS BILIARES.** La otra muestra era enviada al laboratorio de Citología para el análisis citológico, determinando la **DENSIDAD CELULAR** (n° de células por extensión o frotis) y la **COMPOSICION CELULAR** (porcentaje de los distintos tipos de células que aparecen en la bilis).

1.3.-Control anatomo-patológico

En los pacientes trasplantados, con mala función hepática, se realizó biopsia hepática percutánea con aguja gruesa (TRU-CUT), tinción y estudio anatomopatológico al microscopio óptico.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2-DESCRCIPCION TECNICA DE LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS.

2.1.-Método de extracción de la muestra biliar

El tubo de KEHR introducido en el colédoco sale, percutáneamente, a nivel del flanco derecho y, se conecta a un medidor horario de diuresis, que nos permite medir y recoger la bilis drenada por el paciente en cualquier momento. En nuestro estudio, cada día, se recogía la bilis drenada por cada paciente durante **media hora**, periodo adecuado para obtener un volumen suficiente de bilis para realizar su estudio citológico y bioquímico, sin deterioro de la misma. La extracción se realizó, en todos los casos, a primera hora de la mañana con el paciente en ayunas. La bilis se depositaba en dos tubos secos de cristal estériles Monoject^{R} (Sherwood) y se enviaban, uno al laboratorio de Micrométodos y otro al de Citología.

2.2.-Método de determinacion de la citologia biliar

La bilis, remitida en fresco, se vierte en 4 tubos cónicos, cada uno de ellos conectado, mediante un soporte metálico, a un portaobjetos de cristal y, se introducen en la centrifuga (CYTOSPIN^{R} 2, Shandon, U.K.). Se centrifuga el material biliar a 500 r.p.m., durante 5 minutos. Se obtienen cuatro extensiones o frotis que se fijan con alcohol etílico (96°). A continuación, tres de ellos se tiñen por los siguientes métodos:

-Una extensión por el método **DIFF-QUICK**.

-Una extensión con **HEMATOXILINA-EOSINA**.

-Otra con la técnica de **PAPANICOLAOU**.

-Una no se tiñe, observándose directamente en el microscopio.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

De esta forma, se obtuvieron 4 extensiones diarias por paciente (una por cada método de tinción). Las extensiones se observaron en un microscopio de luz (MICROSCOPIO OPTICO NIKON^{R} 119), y se determinaron la **densidad celular** y la **composición celular**. Para ello se dividió cada extensión en 10 campos de gran aumento; se contó el número de células en cada campo y, sumándolas, obtuvimos el número de células por extensión o **densidad celular**. A continuación se determinaba la fórmula o **composición celular,** que es el porcentaje de los distintos tipos celulares que podemos encontrar en la bilis. Estos, fundamentalmente, son:

A) CELULAS INFLAMATORIAS (figuras 1-6):

-LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS (PMN).
-MACROFAGOS (Mc).
-CELULAS MONONUCLEADAS (MN): Linfocitos, Monocitos, C. Plasmáticas.
-BLASTOS (LINFOBLASTOS).
-EOSINOFILOS (Eo).

B) CELULAS EPITELIALES (figura 7):

-CELULAS EPITELIALES DUCTALES (descamadas de los conductos biliares).
-HEPATOCITOS.

C) CELULAS "FANTASMA" (figura 8):

Células, de probable origen epitelial, cuya morfología deteriorada nos impide clasificarlas dentro de alguno de los anteriores tipos.

Todos los frotis fueron realizados y observados al microscopio por el mismo citólogo, que desconocía la evolución clínica del paciente.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Se correlacionaron los resultados citológicos (densidad y composición celular) con la evolución clínica del paciente, diariamente, evidenciada por los signos clínicos, analíticos y, en los casos que se precisó, biopsia hepática y estudio anatomo-patológico.

2.3.-Metodo de determinacion de lípidos biliares (bioquímica biliar)

2.3.1.-EXTRACCION DE LOS LIPIDOS BILIARES.

Para determinar las concentraciones de colesterol y fosfolípidos, hay que aislar dichos componentes del resto de componentes biliares. Para ello se realiza la **extracción de lípidos biliares**:

De la muestra de bilis remitida en el tubo seco, se extraen 0.5 ml y se le añaden 5 ml de solución cloroformo-metanol (2:1) y 1 ml de agua; se agita 1 minuto y se centrifuga a 2.500 r.p.m., 4°C, durante 10 minutos. Con una pipeta Pasteur se retira la fase inferior, depositándola en otro tubo. A la fase superior se le añaden 3 ml de cloroformo-metanol (2:1), se agita durante 1 minuto y se centrifuga en las mismas condiciones que antes. La fase inferior se retira y se mezcla con la que se había obtenido anteriormente. El **extracto lipídico** así obtenido, se somete a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37°C, almacenándose hasta su uso en el congelador.

2.3.2.-DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS: METODO DE FISKE-SUBARROW MODIFICADO POR BARTLETT.

Se disuelve el extracto lipídico, obtenido a partir de 250 microlitros de bilis, en 500 microlitros de cloroformo y se ponen 50 microlitros en un tubo de cristal graduado de 10 ml.

Se prepara la curva patrón, depositando en tubos graduados 100, 300, 600, 1.000, 1.500, 2.000 y 2.500 microlitros de la solución standard. Dejamos un tubo como blanco. Se añade, a todos los tubos, 1.2 ml de ácido perclórico (70%); se agitan y se colocan en un baño a 240 °C, manteniéndolos hasta que desaparezca el color en los tubos que contienen el extracto lipídico (aproximadamente 30 minutos). Dejamos enfriar los tubos y se les añaden 0.4 ml de

UNIVERSIDAD DE MURCIA

molibdato amónico y 0.4 ml de reactivo de FISKE-SUBARROW, completando hasta 10 ml con agua desionizada. Se agitan y se colocan en un baño a 100 °C para que desarrollen el color.

Se mide la **absorbancia** en un espectrofotómetro a 830 nm.

Se consideran valores normales los comprendidos entre 1.9-11.08 mMol/l.

2.3.3.-DETERMINACION DE COLESTEROL: METODO COLORIMETRICO DE SAL DE HIERRO/ACIDO ACETICO.

Disolvemos el extracto lipídico, obtenido a partir de 250 microlitros de bilis, en 6 ml de ácido acético glacial, y se añaden 4 ml de solución reactiva b, dejándolo reposar 10 minutos. A continuación, se prepara una curva standard de colesterol a concentración de 0-1.5 micromol/l.

Se mide el color púrpura en un espectrofotómetro a 550 nm frente a un blanco.

Se consideran valores normales los comprendidos entre 2.5-8.2 mMol/l.

2.3.4.-DETERMINACION DE ACIDOS BILIARES: ENSAYO COMERCIAL ENZIMATICO STEROGNOST-3 ^{R} PHO.

Se numeran 2 tubos, tubo 1 y tubo 2, y se introducen 10 microlitros de bilis en cada uno. Al tubo 1 se le añaden 2.500 microlitros de la solución enzimática Sterognost-3 alpha^{R} Pho. Al tubo 2 se le añaden 2.500 microlitros de Hidracina hidrato. A ambos se les añaden 500 microlitros de Metanol. Se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se lee la absorbancia en cada tubo a 340 nm. Se realiza la diferencia de absorbancia entre ambos tubos, se multiplica por el factor de corrección y obtenemos la concentración de ácidos biliares.

Se consideran valores normales los comprendidos entre 5-40 mMol/l.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

3.-METODO ESTADISTICO.

El método estadístico ha consistido, fundamentalmente, en la realización de los siguientes test:

3.1.-Test de Mann-Whitney:

Este test se utilizó para comparar medias de poblaciones con muestras pequeñas:

-Comparación de la densidad celular media de las extensiones.

-Comparación de las concentraciones medias diarias de los lípidos y del flujo biliar, con tamaños muestrales menores a 30 elementos.

3.2.- Test de la "t" de Student:

Mediante este test se realizó la comparación de medias entre poblaciones con tamaño muestral grande. Así, se utilizó para:

-Comparación de las concentraciones medias diarias de los lípidos biliares y flujo biliar medio diario, con tamaños muestrales mayores a 30 elementos (comparación entre periodos de 6 días).

3.3.-Test de proporciones:

La comparación de los porcentajes medios obtenidos (composición celular media) en el análisis citológico se realizó mediante este test.

En todos los análisis estadísticos se fijó un nivel de confianza mínimo del 95% ($p < 0.05$), y todos los contrastes se efectuaron a dos colas (bilateral).

UNIVERSIDAD DE MURCIA DOCTORADO COMISION GENERAL

UNIVERSIDAD DE MURCIA

III.-RESULTADOS

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

1.-ESTUDIO DESCRIPTIVO

En este apartado, analizamos los resultados obtenidos en las mediciones de los parámetros clínicos, analíticos (perfil hepático) y biliares (citología, flujo y lípidos biliares), tanto del grupo control (coledocolitiasis) como del grupo problema (trasplante). Así mismo, describimos la relación entre dichos parámetros a lo largo del postoperatorio de los pacientes.

1.1.-Grupo Control (Coledocolitiasis)

1.1.1.-EVOLUCION CLINICA

Los 15 pacientes evolucionaron sin complicaciones, manteniendo las constantes físicas (temperatura, pulso y tensión arterial) en el rango de normalidad, no manifestando ningún síntoma ni signo de disfunción orgánica.

A todos los pacientes se les realizó una ecografía hepática de control en el 7° día postoperatorio, no evidenciando anomalías.

1.1.2.-PARAMETROS ANALITICOS SERICOS Y HEMATOLOGICOS

A) Hemograma

Ningún paciente presentó alteraciones significativas.

B) Actividad de protrombina

Todos los pacientes presentaron una actividad de protrombina, en todos los controles analíticos del postoperatorio, dentro de los límites de normalidad (tabla I).

C) Perfil Hepático

Todos los parámetros de la analítica sérica permanecieron dentro de los valores normales considerados por nuestro laboratorio o se normalizaron durante los primeros días del postoperatorio (tabla I).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1.1.3.-FLUJO BILIAR MEDIO

El **flujo, secreción o volumen biliar medio diario**, a través del tubo de KEHR, fue 387.8 +/- 43 ml/día el primer día postoperatorio, aumentando progresivamente hasta el último día de la recogida de bilis o día de la retirada del tubo (día 12°), con niveles medios de 681.8 +/- 66.1 ml/día. Se comparó estadísticamente el flujo biliar medio del día 12° con el flujo medio obtenido todos los días del postoperatorio; los días 1°, 2°, 3° y 6° mostraron valores medios más bajos, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.05$) (tabla II y fig. 9).

Dividiendo el postoperatorio en dos periodos de 6 días, observamos que el flujo biliar medio es significativamente más bajo en el primer periodo (487.9 +/-18 vs 628.8 +/- 26.2 ml/día; $p< 0.0001$) (tabla III y fig. 10).

1.1.4.-PARAMETROS CITOLOGICOS

A) Densidad celular

Las extensiones mostraron una densidad celular media de 53.3 +/- 15.5 células/extensión el primer día postoperatorio, disminuyendo progresivamente durante los primeros días postoperatorios, mostrando, el 4° día postoperatorio, una media de 11 +/- 4.9 células/extensión, a partir del cual las extensiones fueron acelulares. Se realizó el contraste de medias entre el primer día y los demás, resultando significativamente menor la densidad obtenida a partir del día 3° ($p< 0.05$) (tabla IV y fig. 11).

B) Composición Celular

Los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) constituyeron el tipo celular predominante, con porcentajes que oscilaron entre el 81.2% y el 94%.

Las células epiteliales (CE) constituyeron el segundo tipo en frecuencia, alcanzando el mayor porcentaje el 2° día (16.7%).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Otras células inflamatorias como los macrófagos (Mc) y las células mononucleadas (MN) aparecieron los días 2°, 3° y 4° en porcentajes muy bajos, próximos al 1% (tabla IV).

Ninguna extensión evidenció células fantasma (CF), eosinófilos (Eo) ni blastos (B).

No se observaron diferencias significativas entre los 5 primeros días, respecto a la composición celular (tabla IV).

Los patrones citológicos diarios establecidos se pueden observar en las tabla VI y figura 12. Las figuras 13 y 14 corresponden a dos extensiones obtenidas el día 1° y 4° del postoperatorio, respectivamente.

1.1.5.-PARAMETROS BIOQUIMICOS BILIARES (LIPIDOS BILIARES).

A) Fosfolípidos

La concentración media de fosfolípidos en bilis se evidenció baja el primer día postoperatorio (2 +/- 0.6 mMol/l), aumentando progresivamente hasta el último día de la recogida de bilis, día 12° (8.3 +/- 0.9 mMol/l). Al comparar la concentración media obtenida el día 12° con los demás días, observamos diferencias estadísticamente significativas ($p< 0.05$) en los 5 primeros días; a partir del 5° día las concentraciones medias diarias, aunque inferiores, no mostraron diferencias significativas (tabla II y fig. 9).

Dividiendo el postoperatorio en dos periodos de 6 días, al realizar el contraste de medias entre ambos, observamos que la concentración media de fosfolípidos aumentaba en el 2° periodo, de forma estadísticamente significativa ($p<0.0001$) (tabla III y fig. 10).

B) Colesterol

La concentración biliar media de colesterol fue, en el primer día postoperatorio, muy baja (1.5 +/- 0.3 mMol/l), por debajo del rango de normalidad, para ir aumentando, hasta alcanzar el valor máximo el día 12° (5.9 +/- 0.7 mMol/l), último día de la recogida de bilis. Los 8 primeros días postoperatorios mostraron concentraciones medias de colesterol más bajas que

UNIVERSIDAD DE MURCIA

el día 12°, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.05$); los días 9°, 10° y 11° también mostraron valores menores, aunque no de forma significativa (tabla II y fig. 9).

Como se puede observar en la figura 10, el segundo periodo del postoperatorio mostró una concentración media significativamente más alta que el primero ($p< 0.0001$).

C) Acidos Biliares

La concentración media de ácidos biliares más baja fue la del 2° día postoperatorio (8.7 +/- 1.3 mMol/l), aumentando progresivamente, alcanzando el valor máximo el día 11° (29.6+/- 4.1 mMol/l), día previo al de la retirada del tubo de Kehr. Los cinco primeros días mostraron concentraciones medias más bajas que el último día (día 12°) de forma estadísticamente significativa ($p< 0.05$); a partir del 5° día, no existieron diferencias significativas (tabla II y fig. 9).

La concentración media en el segundo periodo de 6 días del postoperatorio fue significativamente más alta que en el primero ($p< 0.0001$) (tabla III y fig. 10).

D) Correlación entre los parámetros biliares y el perfil hepático

En la figura 11 se puede observar como la **celularidad** decrece desde el primer día postoperatorio y desaparece en el 5°, mientras que el **flujo biliar medio diario** aumenta progresivamente, alcanzando el 4° día valores que no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al 12°, último día de recogida de bilis. Las concentraciones medias de los **lípidos biliares** aumentan, progresivamente, desde el primer día postoperatorio, alcanzando valores sin diferencia estadística respecto al día 12°, entre el 5°-8° día (fig. 9). Los parámetros séricos del **perfil hepático** se normalizaron durante el postoperatorio inmediato (tabla I).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1.2.-Grupo Trasplante

1.2.1.-EVOLUCION CLINICA

Se realizaron 29 trasplantes de hígado en 25 pacientes; 16 pacientes (incluidos los 4 retrasplantes) evolucionaron sin complicaciones en el postoperatorio. Cuatro manifestaron **fallo o disfunción primaria del injerto**, requiriendo retrasplante; las muestras biliares para análisis citológico y bioquímico obtenidas durante esta complicación fueron 12 (una muestra por día y paciente). Los episodios de **rechazo** fueron 7 (6 pacientes); globalmente, las muestras biliares obtenidas los días en que se detectó dicha complicación fueron 32 (16 muestras pertenecieron al 2° periodo de 6 días del postoperatorio y las otras 16 al 3°). Los episodios de **sepsis** fueron 3 (3 pacientes), acaecidos todos durante el 2° periodo, y aportaron 17 muestras.

1.2.2.-PARAMETROS ANALITICOS SERICOS Y HEMATOLOGICOS.

A) Hemograma.

Los 16 pacientes que evolucionaron bien, mantuvieron los hemogramas dentro de los límites normales. Los pacientes que presentaron alguna complicación (fallo primario del injerto, sepsis o rechazo) mostraron leucocitosis marcada con desviación izquierda, durante la misma.

B) Actividad de Protrombina.

La actividad de protrombina media diaria de los pacientes trasplantados queda reflejada en las tablas V y VI. Como muestran las tablas, la actividad de protrombina media disminuyó durante las complicaciones del injerto. Los valores más bajos se obtuvieron en los pacientes con fallo primario del injerto.

C) Perfil hepático.

Los parámetros séricos se fueron normalizando progresivamente en el postoperatorio, en los pacientes que no presentaron complicaciones (tabla V).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Los pacientes que presentaron fallo hepático primario, sepsis y rechazo mostraron valores anormalmente altos de dichos parámetros (tablas VI).

1.2.3.-FLUJO BILIAR

***Pacientes con evolución normal**:

El flujo biliar medio diario (volumen medio diario de bilis drenado a través del tubo de KEHR) en los pacientes que tuvieron **buena evolución** fue muy bajo el primer día postoperatorio (140.5 +/- 20.8 ml/día), aumentando progresivamente hasta alcanzar el valor máximo el último día de la recogida de muestras biliares (día 18°, con 516.2 +/- 36.7 ml/día). La comparación estadística del flujo medio obtenido el día 18° con el de los demás días, evidenció diferencias significativas hasta el 10° día ($p<0.05$), (tabla VII y fig. 15).

Al dividir el postoperatorio en 3 periodos de 6 días, observamos que el flujo biliar medio en el 3° periodo era mayor que en los otros dos periodos, así como el 2° mayor que el 1°, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0001$) (tabla VIII y fig. 16).

***Fallo hepático primario o disfunción primaria del injerto:**

Los pacientes con **fallo hepático primario** evidenciaron un flujo biliar medio diario más bajo (91.2 +/- 38 ml/día), de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0001$), al compararlo con el producido por los pacientes trasplantados con evolución normal durante los 6 primeros días postoperatorios (226.8 +/- 15 ml/día) (tablas IX y X y fig. 17).

***Rechazo**:

Los pacientes que sufrieron algún episodio de **rechazo** (en los periodos 2° y 3°) mostraron un flujo biliar medio diario más bajo durante dicho episodio (169.4 +/- 27.8 y 176.4 +/- 32.4 ml/día durante los episodios ocurridos en los periodos 2° y 3°, respectivamente), de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0001$), respecto a los pacientes trasplantados con evolución normal, en esos mismos periodos (tablas IX y X y figura 17).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

***Sepsis**:

El flujo biliar medio diario durante los episodios de **sepsis** (todos ellos en el 2° periodo) no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al flujo aportado por los pacientes trasplantados con evolución normal en ese mismo periodo (315.9 +/- 27.6 vs 388.4 +/- 16 ml/día, respectivamente). Al compararlo con el flujo medio producido durante los episodios de rechazo, en el 2° periodo, se observa mayor volumen en los episodios de sepsis, de forma significativa ($p < 0.0001$) (tablas IX y X y fig. 17).

1.2.4.-PARAMETROS CITOLOGICOS.

A) Densidad Celular.

Se obtuvieron **1152** extensiones (4 cada día postoperatorio y por paciente). A efectos prácticos, dado que coincidían los resultados obtenidos con los 4 métodos de tinción realizados, tanto en la densidad como en la composición celular, consideramos una extensión por día y paciente, de forma que el n° de extensiones consideradas quedó limitado a **288** (100 de los cuales corresponden a los 4 primeros días postoperatorios, incluidos las 12 extensiones de los pacientes con fallo primario del injerto).

*** Evolución normal:**

Las extensiones obtenidas en el primer día postoperatorio fueron las que presentaron una mayor celularidad (con una media de 115.6 +/- 31.4 cels./extensión), decreciendo progresivamente durante los primeros días postoperatorio, mostrándose acelulares a partir del 5° día (con una media de 2.5 +/- 1 cels./extensión este día). Tomando como valor de referencia el día 1°, el contraste de medias con los otros días mostró un descenso, estadísticamente significativo, a partir del día 2° ($p < 0.05$). A partir del 5° día, sólo se objetivaron 5 extensiones celulares (con 50 células/extensión) sin evidenciarse ninguna alteración clínica ni analítica (tabla XI y figura 18).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

*** Evolución con rechazo:**

Los pacientes que presentaron algún episodio de **rechazo** manifestaron un aumento súbito de la densidad celular durante el episodio; este aumento precedió en un día a las alteraciones analíticas del perfil hepático, en 4 de los 7 episodios (figura 19).

Las extensiones obtenidas durante los 32 días en que se diagnosticó rechazo, mostraron una alta densidad celular, con una media de 273.4 +/- 59.9 cels./extensión; esta densidad media fue significativamente mayor que la densidad media observada en cada uno de los primeros días postoperatorios de los pacientes trasplantados sin complicaciones ($p< 0.05$) (tablas XII y XIII y figura 20). Como se puede apreciar en las figura 21, la celularidad mostró un aumento súbito coincidiendo con las alteraciones analíticas en suero; la biopsia confirmó el diagnóstico de rechazo y, al aumentar la inmunosupresión, desapareció la celularidad, normalizándose el perfil hepático. La figura 22 muestra un episodio de rechazo que no respondió inicialmente al tratamiento, manteniendo extensiones con alta celularidad, y precisó otra pauta, que resultó efectiva, como se evidenció por la normalización clínica, analítica y citológica.

Para determinar la eficacia de la citología biliar como test para el diagnóstico del rechazo, considerando la densidad celular, se determinaron la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo del test. La **sensibilidad** fue del **93.75%** y la **especificidad** del **97.34%**; el **valor predictivo positivo** fue del **85.71%** y el **negativo** del **98.91%**.

*** Sepsis**:

Los 3 pacientes que desarrollaron un cuadro de sepsis mostraron elevación súbita de la densidad celular en las extensiones biliares, coincidiendo con las alteraciones analíticas séricas. En un caso, las alteraciones celulares antecedieron en 2 días al diagnóstico clínico (figura 23).

Las 17 extensiones recogidas en los 17 días de **sepsis** mostraron alta celularidad, con una densidad celular media de 85.9 +/- 5.5 cels./extensión; al comparar esta densidad media con la obtenida en cada una de los 5 primeros días del postoperatorio de los pacientes trasplantados con evolución normal, en la sepsis se observa mayor densidad celular media que los días 2°, 3°, 4° y 5°, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.005$) (tablas XII y XIII). Con relación al rechazo, la sepsis mostró una densidad celular media menor, de forma significativa ($p< 0.05$) (tablas XII y XIII y figura 20). En las figura 23 se puede observar el postoperatorio de un

UNIVERSIDAD DE MURCIA

paciente que presentó un episodio de sepsis alrededor del día 7°, con hemocultivo positivo para *aspergillus fumigatus*. Otro paciente presentó un episodio de sepsis por *estafilococus epidermidis*. El origen del otro episodio de sepsis fue una colangitis aguda; el germen causal (*estreptococus fecalis*) se detectó en las extensiones biliares (fig. 25).

Considerando la densidad celular, se evaluó la eficacia de la citología como test diagnóstico de la sepsis, y obtuvimos una **sensibilidad** del **100%** y una **especificidad** del **97.34%**; el **valor predictivo positivo** fue del **77.27%** y **el negativo** del **100%**.

*** Fallo primario del injerto:**

Las 12 extensiones obtenidas bajo el diagnóstico de **fallo primario del injerto** mostraron alta celularidad, con una densidad celular media de 98.3 +/- 12.4 cels./extensión (tabla XII, fig. 20). Dicha densidad celular fue significativamente mayor ($p< 0.01$) que la densidad celular media obtenida los días 2°, 3°, 4° y 5° en los pacientes trasplantados con evolución normal (tablas XI, XII y XIII).

Con respecto al rechazo y a la sepsis, los pacientes con fallo primario no mostraron diferencias significativas en la densidad celular media (tabla XIII y figura 20).

La figura 24 representa la evolución citológica de un paciente con fallo primario del injerto.

B) <u>Composición Celular</u>

*** Evolución normal:**

Los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) fueron el tipo celular más abundante, alcanzando el máximo porcentaje el día 1° del postoperatorio con un 80.3%. Las células epiteliales constituyeron el 2° tipo más abundante, con un 13.1% el día 1°, alcanzando el máximo porcentaje en el día 3° (37.8%). Las células "fantasma" constituyeron un tipo poco abundante, alcanzando el máximo porcentaje el 5° día postoperatorio (13%).

El resto de tipos celulares apareció en porcentajes muy bajos (0-2.9%). No se objetivaron blastos (tabla XI y figura 26).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Se compararon los porcentajes celulares medios obtenidos cada día; no se evidenciaron diferencias significativas entre los primeros días postoperatorios, respecto a la composición celular (tabla XI).

*** Evolución con episodio de rechazo:**

Las extensiones obtenidas durante los episodios de **rechazo** mostraron una composición celular media con predominio de células inflamatorias, sobre todo de neutrófilos PMN (84.2%), constituyendo las células mononucleadas y los macrófagos los siguientes tipos en frecuencia con porcentajes próximos al 7% cada uno. Las células epiteliales y las fantasma se evidenciaron muy escasas (1.3% y 0.6% respectivamente). En 6 extensiones se observaron blastos (tabla XII y figura 27). Al comparar dicha composición celular con la composición celular media obtenida durante los primeros días del postoperatorio en los pacientes trasplantados que evolucionaron sin complicaciones, el rechazo mostró mayor porcentaje de células mononucleadas y menor de células epiteliales, de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$); el mayor porcentaje de PMN observado en el rechazo, aunque próximo a la significación, no mostró diferencia significativa (tabla XIV).

*** Sepsis**:

Durante los episodios de **sepsis**, las extensiones mostraron, casi exclusivamente, neutrófilos polimorfonucleares (96.5%); las células mononucleadas y los macrófagos evidenciaron porcentajes muy bajos (2.5% y 1%, respectivamente); no se objetivaron células epiteliales ni "fantasma" ni blastos (tabla XII y figura 27).

Al comparar la composición celular media durante los episodios de sepsis con la obtenida durante los primeros días postoperatorios en los pacientes trasplantados que evolucionaron sin complicaciones, la sepsis mostró un porcentaje medio mayor de PMN y menor de células epiteliales, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). No se objetivaron diferencias significativas con el rechazo, respecto a la composición celular (tabla XIV).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

*** Fallo primario del injerto**:

El **fallo primario del injerto** evidenció extensiones con abundantes células epiteliales (con un porcentaje medio del 29.2%), aunque predominaron los polimorfonucleares (59.2%); no se observaron células "fantasma" ni blastos (tabla XII y figura 27). Los macrófagos y las células mononucleadas mostraron unos porcentajes medios del 5.8 y 2.5%, respectivamente. Esta composición celular no mostró diferencias significativas respecto a la obtenida durante los primeros días del postoperatorio en los pacientes trasplantados con evolución normal. Sin embargo, respecto a la sepsis y al rechazo, el fallo primario evidenció menor porcentaje medio de PMN y mayor de células epiteliales, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas ($p< 0.05$) (tabla XIV).

1.2.5.- PARAMETROS BIOQUIMICOS BILIARES

A) <u>Fosfolípidos</u>

*** Evolución normal**:

La concentración media diaria de fosfolípidos fue muy baja el día 1° (1.8 +/- 0.3 mMol/l) del postoperatorio y aumentó progresivamente, alcanzando el máximo valor, el día del clampaje del tubo de Kehr (último día de recogida de muestras biliares en el grupo de pacientes trasplantados), día 18° (6.7 +/- 0.5 mMol/l). Se comparó la concentración media obtenida cada día del postoperatorio con la del día 18, evidenciándose niveles medios más bajos ($p< 0.05$) durante los 10 primeros días (tabla VII y figura 15).

Al dividir el postoperatorio en 3 periodos de 6 días, se observó que la concentración media diaria en el periodo 3° del postoperatorio (5.7 +/- 0.3 mMol/l) fue mayor que en los otros dos periodos, así como la del 2° mayor que la del primero (4.5 +/- 0.2 y 3.4 +/- 0.3 mMol/l, respectivamente) de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0001$) (tabla VIII y figura 16).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

*** Evolución con fallo primario del injerto**:

Los pacientes que presentaron **fallo primario del injerto**, manifestaron concentraciones casi indetectables de fosfolípidos (con una media de 0.2 +/- 0.02 mMol/l). Al comparar dicha concentración media diaria con la obtenida durante el primer periodo del postoperatorio en pacientes con evolución normal, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p< 0.0001$) (tablas VIII, XI y X y figura 28).

*** Evolución con rechazo**:

Durante los episodios de **rechazo** (evidenciados en los periodos 2° y 3°), la concentración media diaria de fosfolípidos mostró valores, significativamente, más bajos (2.2 +/- 0.5 y 0.8 +/- 0.2 mMol/l, respectivamente; $p< 0.0001$) que los obtenidos, en esos mismos periodos, en los pacientes trasplantados con evolución normal (tablas VIII, IX y X y figura 28).

*** Evolución con sepsis**:

En los episodios de **sepsis** (2° periodo), la concentración media de fosfolípidos también fue menor, de forma significativa ($p<0.0001$), que la de los pacientes con evolución normal en ese mismo periodo (con concentraciones medias de 1.5+/- 0.1 vs 4.5 +/- 0.2 mMol/l, respectivamente) (tablas VIII, IX y X y figura 32). No se observaron diferencias significativas entre el rechazo y la sepsis respecto a la concentración media diaria de fosfolípidos (tablas IX y X y figura 28).

B) <u>Colesterol</u>

*** Evolución normal**

Las concentraciones medias diarias de colesterol en bilis, inicialmente muy bajas (1.4 +/- 0.2 mMol/l) aumentaron, progresivamente, durante el postoperatorio y alcanzaron el nivel máximo el día 18° (4.3 +/- 1.2 mMol/l). Al comparar la concentración media del día 18° con las obtenidas los demás días, se observaron niveles medios más bajos durante los 9 primeros días y en los días 13° y 15°, de forma significativa ($p< 0.05$) (tabla VII y figura 15).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dividiendo el postoperatorio en 3 periodos de 6 días, observamos que la concentración media diaria de colesterol aumentaba, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.05$), en el 2° periodo (2.2 +/- 0.2 mMol/l en el 1° vs 2.9 +/- 0.2 mMol/l en el 2°), no mostrando cambios significativos entre los periodos 2° y 3° (3.3 +/- 0.4 mMol/l) (tabla VIII y figura 16).

*** Fallo primario del injerto**

Los pacientes con **fallo primario del injerto** tuvieron una concentración media diaria de colesterol más baja (0.2 +/- 0.1 mMol/l), de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0001$), que los pacientes trasplantados con evolución normal (tablas VIII, IX, X y figura 29).

*** Rechazo**

Durante los episodios de **rechazo** (manifestados en los periodos 2° y 3°), la concentración media diaria disminuyó (1.6 +/- 0.4 y 0.8 +/- 0.1 mMol/l, respectivamente), de forma estadísticamente significativa ($p< 0.0005$), respecto a las obtenidas durante dichos periodos en los pacientes trasplantados que evolucionaron sin complicaciones (tablas VIII, IX y X y figura 29).

*** Sepsis**

Los episodios de **sepsis** (manifestados durante el 2° periodo) mostraron una concentración media diaria de colesterol más baja (1.1 +/- 0.1 mMol/l) que la obtenida durante el 2° periodo del postoperatorio de los pacientes trasplantados que no sufrieron complicaciones, de forma significativa ($p< 0.0001$). No existieron diferencias en la concentración media diaria de colesterol, entre los pacientes con sepsis y los que presentaron rechazo durante el mismo periodo del postoperatorio (2° periodo) (tablas VIII, IX y X y figura 29).

C) <u>Acidos biliares</u>

*** Evolución normal**:

La concentración media diaria de ácidos biliares, como ocurrió con el flujo y los otros lípidos, fue muy baja el primer día del postoperatorio (3.7 +/- 0.6 mMol/l), y fue aumentando a

UNIVERSIDAD DE MURCIA

lo largo del postoperatorio, hasta alcanzar el nivel máximo el día 18° (20 +/- 3.3 mMol/l). Respecto a este día, sólo los dos primeros días mostraron valores medios más bajos, de forma estadísticamente significativa ($p< 0.01$) (tabla VII y fig. 15).

Dividiendo el postoperatorio en 3 periodos de 6 días, observamos un aumento significativo ($p< 0.005$) de la concentración media diaria en el 2° periodo (12.6 +/- 0.8 mMol/l y 17 +/- 1 mMol/l en el 1° y 2° periodos, respectivamente), no existiendo diferencias entre el 2° y 3° (17.6 +/- 1.3mMol/l) (tabla VIII y figura 16).

*** Fallo primario del injerto**:

Los pacientes que presentaron **fallo primario del injerto** mostraron concentraciones medias diarias de ácidos biliares casi indetectables (0.4 +/- 0.1 mMol/l). En el contraste de medias, estos pacientes presentaron niveles más bajos que los pacientes trasplantados con evolución normal en el primer periodo postoperatorio, de forma significativa ($p< 0.0001$) (tablas IX y X y figura 30).

*** Rechazo:**

Durante los episodios de **rechazo** (periodos 2° y 3°), la concentración media diaria de ácidos biliares disminuyó (8.9 +/- 2.2 y 3.1 +/- 0.6 mMol/l, respectivamente), de forma significativa ($p< 0.0001$) en relación a los pacientes trasplantados con buena evolución, durante dichos periodos (tablas VIII, IX y X y figura 30).

*** Sepsis**:

Las muestras biliares recogidas durante los episodios de **sepsis** (2° periodo) evidenciaron una concentración media diaria menor (6.7 +/- 1 mMol/l), de forma significativa ($p< 0.0001$) que las recogidas en los pacientes trasplantados con buena evolución, durante el mismo periodo postoperatorio (tablas VIII, IX, X y figura 30).

No existieron diferencias significativas, en la concentración media diaria de ácidos biliares, entre el grupo de pacientes con episodio de rechazo durante el 2° periodo postoperatorio y el grupo con sepsis (tablas IX y X y figura 30).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2.-ESTUDIO COMPARATIVO

En este apartado, analizamos las diferencias evidenciadas entre el **grupo control** (coledocolitiasis) y el **grupo de pacientes trasplantados con evolución normal**, en los parámetros biliares citológicos y bioquímicos.

2.1.-PARAMETROS CITOLOGICOS

A)Densidad celular

En ambos grupos, solo se obtuvieron extensiones celulares en los 5 primeros días postoperatorios. No se observaron diferencias significativas, al comparar día a día, la densidad celular media entre ambos grupos (tabla XV).

B)Composición celular

Respecto a la composición celular media (porcentaje medio de cada tipo celular), día a día, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, pero al comparar globalmente los 5 primeros días postoperatorios, el grupo control evidenció mayor porcentaje de PMN y menor de células epiteliales y células fantasma de forma significativa ($p< 0.05$) (tabla XVI y fig. 31).

2.2.-FLUJO BILIAR Y PARAMETROS BIOQUIMICOS (LIPIDOS BILIARES)

A) Flujo biliar

Ambos grupos manifestaron un aumento progresivo del flujo biliar (volumen diario de bilis), a través del tubo de Kehr, desde el primer día postoperatorio. Comparando el flujo biliar medio día a día, se observaron, de forma significativa ($p< 0.05$), mayores valores en el grupo

UNIVERSIDAD DE MURCIA

control. Los pacientes trasplantados mostraron niveles similares a los del último día de recogida de bilis en el grupo control (día 12°) a partir del día 16° del postoperatorio (tablas XVII, XVIII y figura 32).

Respecto a los periodos de 6 días, el grupo control mostró un flujo medio diario mayor, de forma significativa ($p< 0.0001$), en ambos periodos (tabla XIX y figura 33). También mostró valores medios mayores el 2° periodo del grupo control que el 3° del grupo trasplante.

B) Fosfolípidos

Al comparar, día a día, la concentración media de fosfolípidos, el grupo control siempre mostró valores superiores. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p< 0.05$) desde el día 5° del postoperatorio. A partir del 16° día, la concentración media diaria de fosfolípidos obtenida en los pacientes trasplantados, alcanza niveles similares a los del grupo control en el día 12° (último día de obtención de bilis en este grupo) (tablas XVII y XVIII y figura 34).

Comparando los periodos de 6 días, observamos que el grupo control presentó mayores concentraciones, de forma significativa, que el grupo trasplante ($p<0.05$); el periodo 2° del grupo control evidenció una concentración media diaria superior al grupo trasplante en su periodo 3° ($p< 0.0001$) (tabla XIX y figura 35).

C) Colesterol

Los dos grupos mostraron concentraciones progresivamente mayores a lo largo del postoperatorio, si bien, el grupo control presentó mayores niveles medios diarios de colesterol biliar, siendo significativas las diferencias desde el 5° día postoperatorio ($p< 0.05$) (tablas XVII y XVIII y figura 36). El grupo de pacientes trasplantados alcanzó en el día 17° concentraciones similares a las obtenidas en el día 12° del grupo control.

El grupo control evidenció en los dos periodos del postoperatorio, mayores concentraciones medias diarias que el grupo trasplante en sus periodos correspondientes, de forma significativa ($p< 0.005$) (tabla XIX y figura 37). El 2° periodo del grupo control presentó

UNIVERSIDAD DE MURCIA

mayor concentración media que el periodo 3° del grupo trasplante, de forma significativa ($p< 0.0005$).

D) Acidos biliares

La concentración media diaria de ácidos biliares también se mostró mayor en el grupo control; las diferencias fueron significativas el día 1° y en el periodo comprendido entre los días 7° y 15° del postoperatorio ($p< 0.05$) (tabla XVII y figura 38). A partir del día 16°, el grupo de pacientes trasplantados alcanzó concentraciones medias diarias similares a las obtenidas en el grupo control el día 12° (tabla XVIII).

Considerando el postoperatorio dividido en periodos de 6 días, entre los dos grupos, en la concentración media diaria de ácidos biliares, no existieron diferencias significativas en el primer periodo del postoperatorio, que sí se evidenciaron en el 2° ($p< 0.0001$) y entre el 2° del grupo control y el 3° del grupo trasplante ($p< 0.0001$) (tabla XIX y figura 39).

UNIVERSIDAD DE MURCIA — DOCTORADO — COMISIÓN GENERAL

UNIVERSIDAD DE MURCIA

IV.-DISCUSION Y COMENTARIOS

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

I.-SOBRE LA CITOLOGIA BILIAR SIMPLE O EXFOLIATIVA.

1-COMENTARIOS SOBRE EL METODO.

Aunque la bilis es un fluido que preserva bien las células (143), pensamos que, acorde con lo referido por ROBERTI y OLDHAFER (40, 136), la recogida de la misma no debe durar más de 30 minutos, y debe realizarse la tinción inmediatamente, evitando así el deterioro y lisis celular. De esta forma evitamos frotis o extensiones falsamente acelulares o con células no clasificables debido a su deterioro. La ausencia de células "fantasma", mostrada por estos autores, contrasta con el alto porcentaje de las mismas obtenido por KUBOTA et al. (13, 144, 146) probablemente debido a que estos últimos no utilizaron bilis fresca.

Nosotros hemos utilizado el método descrito por ROBERTI et al. (40) para la obtención de las extensiones celulares, por su sencillez y alta fiabilidad, mayor que la de otros grupos de investigación (136, 146). Además, hemos considerado necesario obtener tres frotis más por cada paciente y día, dejando uno sin teñir, otro teñirlo con Hematoxilina-eosina y otro con el método de Papanicolaou, y así determinar que método es el más adecuado para obtener la densidad y composición celular. Al obtener idénticos resultados, evidenciamos la utilidad de todos ellos.

La densidad y composición celular de cada extensión se ha determinado utilizando el microscopio óptico con campos de gran aumento, tal como realizaron ROBERTI et al. (40), por ser un método sencillo, rápido y fiable.

Hemos preferido diferenciar, en la composición celular, los distintos tipos celulares individualizados, tal como realizaron KUBOTA et al. (13, 143, 144) y OLDHAFER et al. (136), por ser una clasificación más detallada que la de otros autores (40), con la intención de observar posibles diferencias entre las distintos tipos de células inflamatorias según las complicaciones del injerto. El grupo de ROBERTI (40) solo diferencia entre células epiteliales e inflamatorias.

Tal como han realizado todos estos autores (13, 40, 136, 143, 144, 146), las extensiones eran analizadas por el mismo citólogo, que desconocía la evolución clínica del

UNIVERSIDAD DE MURCIA

paciente y, de forma retrospectiva, se correlacionaron los resultados citológicos con el status clínico y el perfil hepático del paciente, día a día.

En todas las extensiones obtenidas se realizó el contaje celular, pero se consideraron positivas para el diagnóstico de las complicaciones aquellas con más de 50 células, a partir del 4° día, ya que dicha densidad celular refleja la lesión hepática con alta fiabilidad (40, 146), disminuyendo la fiabilidad por debajo de dicha densidad. Las extensiones obtenidas durante los 4 primeros días, aunque se analizaron, se excluyeron para el diagnóstico de las complicaciones, ya que todos los pacientes trasplantados presentan extensiones con alta celularidad durante este periodo postoperatorio, sin que tenga significado patológico, tal como indican múltiples autores (13, 40, 136, 140, 144, 145, 146).

2.-CITOLOGÍA BILIAR SIMPLE O EXFOLIATIVA EN PACIENTES CON COLEDOCOLITIASIS .

Es un hecho conocido en la literatura médica que, junto a la membrana basal de los conductillos biliares, pueden aparecer células inflamatorias (leucocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos) cuyo número y tipo depende de la existencia o no de algún proceso inflamatorio del hígado y/o vías biliares, así como de las características del mismo. Dichas células, junto a las células epiteliales descamadas de los conductos, pueden aparecer en la bilis, en virtud de su capacidad de atravesar la membrana basal (56, 59). Algunos autores han descrito las características de la celularidad biliar en individuos sin patología (59, 139), evidenciando la presencia de escasas células epiteliales y algún leucocito PMN.

Por otro lado, las neoplasias de la vía biliar y páncreas generan células anómalas que pueden descamarse en su luz y, por consiguiente, aparecer en la bilis (108, 127, 128, 129, 130, 131). Basándose en estas observaciones, numerosos autores han estudiado la celularidad biliar (124, 127-131, 134, 135, 139, 140), demostrando que constituye un método diagnóstico adicional en la detección de patología neoplásica e inflamatoria del área hepatobiliar y pancreática.

Diversos estudios realizados con citología biliar simple o exfoliativa (124, 139, 140) han demostrado un aumento de la densidad celular, a expensas de células epiteliales y leucocitos

UNIVERSIDAD DE MURCIA

PMN, en la coledocolitiasis, tras la manipulación instrumental del colédoco (coledocoscopia, catéteres,...) y en los procesos inflamatorios de las vías biliares.

Nuestro estudio en pacientes coledocotomizados por patología litiásica, portadores de un tubo de Kehr, han mostrado una alta densidad celular en los primeros días del postoperatorio, probablemente debido a diversos factores, como la presencia de cálculos y, sobre todo, la manipulación e instrumentación sobre la vía biliar (sonda de Fogarty, coledocoscopio, pinzas extractoras de cálculos), que al producir un efecto inflamatorio local leve, provocan la aparición de leucocitos PMN y de la descamación de algunas células epiteliales. La escasez de células mononucleadas y de macrófagos, así como la desaparición de la celularidad al 5° día postoperatorio, evidencian la inexistencia de algún proceso inflamatorio parenquimatoso concomitante. Como mencionamos anteriormente, coincidiendo con algunos autores (40, 136), la ausencia de células "fantasma", evidenciada en nuestro estudio, es debida a la utilización de bilis fresca para el estudio, sin dejar tiempo al deterioro celular.

Aunque los métodos de tinción permiten detectar la existencia de gérmenes (13, 143), al excluir de nuestro estudio, en el grupo control (coledocolitiasis), a los pacientes con colangitis, no encontramos extensiones con bacterias u hongos.

Todos los pacientes mostraron extensiones acelulares a partir del 4°-5° día postoperatorio, hecho que se correlacionó con una evolución postoperatoria sin complicaciones. Así, consideramos a éste como el patrón citológico normal de referencia, que utilizamos para contrastar con los obtenidos en el grupo de pacientes trasplantados.

3.-LA CITOLOGÍA BILIAR SIMPLE O EXFOLIATIVA EN LOS PACIENTES TRASPLANTADOS.

3.1.-PATRON CITOLOGICO EN LOS PACIENTES CON EVOLUCION NORMAL. EFECTOS DE LA PRESERVACION DEL ORGANO.

***Densidad celular**:

Es un hecho constatado que durante el trasplante hepático el injerto sufre, invariablemente, un periodo de isquemia que produce cierto grado de lesión (13, 34, 40, 89,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

136, 144, 146), fundamentalmente en las células ductulares, muy sensibles a la isquemia, y desencadena un proceso inflamatorio agudo que conlleva la aparición de leucocitos PMN en el parénquima hepático, alrededor de las células ductulares; estas se descamarían a la luz de los conductillos biliares y, junto a los leucocitos PMN con capacidad de atravesar la membrana basal, aparecerían en la bilis. En nuestro estudio obtuvimos la mayor densidad celular el día 1° del postoperatorio, tal y como describen KUBOTA (13, 140, 143, 144) y ROBERTI (40), mientras que OLDHAFER (136) la obtiene el día 3°, para ir decreciendo paulatinamente, hasta desaparecer durante la 1ª semana del postoperatorio. A partir de ese momento, y con el restablecimiento del injerto, con la consiguiente desaparición del proceso inflamatorio, las extensiones fueron acelulares en los pacientes que no sufrieron complicaciones, coincidiendo los resultados con los aportados por los investigadores reseñados. Las 5 extensiones con 50 células (PMN) obtenidas en estos pacientes durante la 3ª semana del postoperatorio, no se correlacionaron con ninguna alteración clínica ni analítica; aunque no encontramos una causa clara, podría explicarse por algún movimiento del tubo de Kehr, relacionado con cambios posturales del paciente, que irritase la vía biliar, o por algún proceso subclínico autolimitado que pasó desapercibido.

Para aquilatar el efecto isquémico de la preservación del órgano sobre la densidad celular biliar, comparamos los resultados obtenidos en las extensiones de los pacientes trasplantados con evolución normal con las de los pacientes del grupo control (coledocolitiasis). Aunque se obtuvieron extensiones con mayor densidad celular media en el grupo de pacientes trasplantados, durante los dos primeros días postoperatorios, las diferencias no fueron significativas, lo que indica que la isquemia sufrida por el injerto durante su preservación, no afecta de forma importante a la densidad celular, en contra de la opinión de los autores mencionados (13, 40, 136, 140, 144, 146), aunque contribuye, junto a la manipulación instrumental y la presencia del tubo de Kehr, a la aparición de alta celularidad en la bilis de estos pacientes en el postoperatorio inmediato. Por otro lado, el descenso significativo de la densidad celular mostrado el día 3° respecto al primer día, indica una rápida recuperación del injerto, confirmada por la aparición de extensiones acelulares a partir del día 5°.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

*** Composición celular:**

Junto a la determinación de la densidad celular, diversos grupos de investigación han descrito los distintos tipos celulares que se pueden obtener en la bilis de los pacientes trasplantados, a lo largo del postoperatorio (13, 40, 136, 140, 144, 146). Como hemos comentado anteriormente, la isquemia que sufre el injerto durante las fases del trasplante no condiciona un aumento significativo de la densidad celular y, sin embargo, sí hemos obtenido diferencias en la composición celular, respecto al grupo control. Los pacientes trasplantados mostraron extensiones con mayor proporción de células epiteliales ductulares y "fantasma" que el grupo control, lo que constituye la evidencia de la alta sensibilidad del epitelio ductular a la isquemia. Este hecho ha sido referido por diversos autores (13, 40, 143), cuyos estudios demuestran que en la bilis de los primeros días del postoperatorio de los pacientes trasplantados, junto a los leucocitos PMN aparecían abundantes células epiteliales; sin embargo, OLDHAFER et al. (136) obtuvieron extensiones con PMN casi exclusivamente (las células epiteliales suponían menos del 3%).

Por otra parte, en nuestro estudio, el hecho de que el mayor porcentaje de células epiteliales se observase el día 3° del postoperatorio, demuestra la existencia de un periodo de latencia entre la agresión isquémica y la descamación celular. La presencia de células "fantasma" en el grupo trasplante y no en el grupo control, evidencia el deterioro que, sobre las células epiteliales, ocasiona la isquemia.

3.2.-PATRON CITOLOGICO DEL RECHAZO.

Diversos estudios anatomopatológicos (42, 43, 44, 45, 146, 148, 149) han establecido el patrón histológico del rechazo, caracterizado por la triada: presencia de **infiltrado celular mixto (mononuclear y polinuclear) portal**, **endotelialitis** y **lesión de los conductos biliares**. De los componentes de la triada, es la **lesión de los conductos biliares** el más sensible y específico, aunque no absoluto, marcador del rechazo; además, el grado de severidad del mismo está en relación con el número de conductos afectados. El signo histológico más precoz es el infiltrado celular y, a continuación, la lesión ductular (42, 43, 44, 146).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Estas aportaciones fundamentaron el interés de la citología biliar simple o exfoliativa, como método de diagnóstico precoz del rechazo. Dado que el infiltrado celular afectaría a los conductos biliares, en los momentos iniciales del rechazo, en la bilis aparecerían estas células inflamatorias junto a las epiteliales ductulares dañadas y descamadas (13, 40, 143, 144, 145, 146). KUBOTA et al. (13, 140, 144, 146) establecieron el diagnóstico de rechazo cuando observaron un aumento súbito de la densidad celular a expensas de leucocitos PMN (más del 50% en ausencia de gérmenes) y/o abundante presencia de macrófagos y células mononucleadas y/o presencia de células blásticas, siendo estas últimas patognomónicas del mismo, si bien aparecieron varios días después del inicio del episodio y no en todas las extensiones. Con este método obtuvieron una sensibilidad del 58% y una especificidad del 75% en la detección del rechazo. OLDHAFER (136) describe un aumento súbito de la celularidad, coincidiendo con las alteraciones clínicas y analíticas, destacando la presencia de células mononucleadas (linfocitos fundamentalmente) y hepatobiliares durante el episodio de rechazo. ROBERTI et al. (40) refieren un aumento súbito de la densidad celular con predominio de células inflamatorias en el rechazo, destacando la importancia de los blastos en el diagnóstico, si bien, se observaron en menos del 30% de las extensiones obtenidas durante los episodios. Obtuvieron una sensibilidad del 93% y una especificidad del 96% en el diagnóstico del rechazo.

Estos resultados contrastan, sin embargo, con los obtenidos por DIETZE et al. (139), cuyo estudio no evidenció una clara correlación entre los episodios de rechazo y la composición celular, aunque sí observaron extensiones con alta celularidad (a expensas de PMN) durante dichos episodios. El hecho de no encontrar otras células (especialmente linfocitos y blastos) fue atribuido a la dificultad de las mismas para atravesar el tejido conectivo que rodea a los conductillos biliares.

Nuestro estudio evidenció, de acuerdo con estos investigadores un aumento súbito de la densidad celular, en el día previo a las alteraciones clínico-analíticas o coincidiendo con él, a expensas de PMN y, con menor importancia de células mononucleadas y epiteliales; por otra parte, acorde con los resultados de ROBERTI et al. (40), solo hemos observado blastos en 2 de los 7 episodios de rechazo (6 extensiones), apareciendo desde el primer día del episodio, y no tardíamente como describen KUBOTA et al. (13, 140, 144). Coincidiendo con los resultados de KUBOTA, ROBERTI, REINHOLT y ERICZON (13, 40, 140, 143, 144), hemos de

UNIVERSIDAD DE MURCIA

destacar que no se observaron blastos en ninguna otra complicación, por lo que estas células son consideradas patognomónicas del rechazo. La composición celular obtenida en nuestras extensiones difiere de las descritas por ROBERTI (40) y KUBOTA (13, 140, 144, 146): nosotros hemos encontrado menos células epiteliales y casi no han aparecido células fantasma, probablemente, debido a la gran densidad del infiltrado inflamatorio que "aporta" a la bilis muchas más células que los conductos biliares afectados (que aportarían las epiteliales descamadas) y a la destrucción de estas últimas por el proceso inflamatorio antes de su aparición en bilis; por otro lado, la utilización de bilis fresca disminuyó la presencia de células "fantasma", hecho referido anteriormente. No obstante, de acuerdo con las aportaciones de LAUTENSCHLAGER et al. (152), pensamos que las células epiteliales ductulares, dado su abundante contenido en antígenos HLA de la clase II, juegan un papel muy importante en la patogénesis del rechazo. Respecto a la composición celular obtenida por OLDHAFER (136), hemos observado menor porcentaje de células mononucleadas en nuestras extensiones, aunque este porcentaje ha sido significativamente mayor que el obtenido fuera de los episodios de rechazo; así, consideramos que dichas células poseen un protagonismo importante en el rechazo y se pueden detectar precozmente en las extensiones, a diferencia de los resultados aportados por DIETZE et al.(145).

En nuestro análisis citológico, obtuvimos una **sensibilidad** y una **especificidad** similares a las obtenidas por ROBERTI et al. (40) (mayores del 90%), superiores a las de KUBOTA et al. (146) (que obtuvieron una sensibilidad y una especificidad próximas al 60% y 75%, respectivamente), probablemente por el método de recogida y tinción de las muestras biliares. A la luz del **valor predictivo** obtenido, consideramos al análisis citológico biliar como un método diagnóstico adicional con muy alta fiabilidad en el seguimiento del injerto hepático y en la detección del rechazo .

3.3.-PATRON CITOLOGICO EN LA SEPSIS.

La biopsia hepática realizada en pacientes durante un episodio de sepsis puede evidenciar un cuadro de colestasis intrahepática que, en casos graves, se acompaña de reacción inflamatoria de las vías portales, con infiltrado fundamentalmente de leucocitos PMN, e incluso,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

destrucción canalicular (151). Este hecho puede condicionar el paso de células del infiltrado inflamatorio a la bilis (13, 40). ROBERTI et al. (40) obtienen en los pacientes trasplantados extensiones con alta celularidad, a expensas de leucocitos PMN, durante los episodios de sepsis con repercusión hepática (manifestada en el perfil hepático como una colestasis). KUBOTA et al. (13, 146) y OLDHAFER et al. (136) describieron una elevación súbita de la densidad celular, durante los episodios severos de colangitis, a expensas de leucocitos PMN, pudiéndose detectar los gérmenes en las extensiones. No obstante, todos estos investigadores destacan la necesidad del cultivo bacteriológico (hemocultivos y cultivo biliar) para establecer el diagnóstico definitivo.

En nuestro estudio, las extensiones obtenidas durante los episodios de sepsis mostraron una alta celularidad coincidiendo o antecediendo a las alteraciones en el perfil hepático (en un caso, incluso, dos días antes que las alteraciones en el perfil hepático) a expensas, casi exclusivamente, de leucocitos PMN; es decir, las alteraciones citológicas aparecieron de forma precoz en los episodios de sepsis. La densidad celular media fue menor que en los episodios de rechazo, lo que evidencia que, en estos, la extensión e intensidad del proceso inflamatorio es mayor que en los episodios de sepsis. Sin embargo, no obtuvimos diferencias en la composición celular entre ambas complicaciones, lo que nos impidió establecer un patrón celular que nos distinguiese una y otra. La ausencia de células epiteliales y "fantasma" en las extensiones durante los episodios de sepsis constata poca lesión en los conductos biliares, a pesar de manifestar alteraciones en el perfil hepático, por lo que pensamos que la sepsis ocasiona, fundamentalmente, un trastorno funcional (colestasis) con poca repercusión histológica.

El hecho de que en los 3 pacientes de nuestra serie que presentaron sepsis, las extensiones presentasen de forma súbita alta celularidad, nos permite considerar a la citología biliar exfoliativa un método válido de monitorización seriada del injerto hepático, que en uno de los casos (sepsis por colangitis producida por *estreptococcus faecalis*) estableció el diagnóstico. Globalmente, obtuvimos una **sensibilidad**, una **especificidad** y un **valor predictivo** muy altos, si bien, de acuerdo con la literatura mencionada, el análisis citológico no puede sustituir al cultivo en el diagnóstico definitivo.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

3.4.-PATRON CITOLOGICO EN EL FALLO PRIMARIO DEL INJERTO.

No se ha descrito en la literatura el patrón citológico biliar obtenido bajo fallo o disfunción primaria del injerto. Nuestro estudio evidenció alta densidad celular en las extensiones obtenidas durante esta complicación, superior a la mostrada por los pacientes trasplantados que evolucionaron sin complicaciones en los primeros días postoperatorios, aunque no existieron diferencias en la composición celular. No obstante, fue este el grupo de pacientes cuyas extensiones mostraron el mayor porcentaje de células epiteliales, muy sensibles a la isquemia, lo que parece imbricar a la misma como factor causal de esta complicación. Por otra parte, algunos estudios anatomopatológicos han demostrado la presencia de necrosis isquémica subcapsular en el fallo primario (21, 22) y diversos estudios citológicos (13, 136, 144) demuestran alta celularidad biliar en situaciones de isquemia del injerto (trombosis de la arteria hepática), con alto contenido en células epiteliales. Estos datos avalan la teoría que considera a la isquemia como agente etiopatogénico de esta complicación.

Dado que no existen diferencias importantes en la densidad y composición celular respecto a los pacientes trasplantados con buena evolución, no podemos considerar a la citología como un método útil para el diagnóstico de esta complicación.

II.-SOBRE EL FLUJO Y LOS LIPIDOS BILIARES EN LA MONITORIZACION DE LA FUNCION HEPATICA.

1.-COMENTARIOS SOBRE EL METODO Y EL GRUPO CONTROL.

Diversos estudios han demostrado la estrecha relación entre el volumen de bilis producido por el hígado y el status funcional del mismo (14, 73, 76, 85, 87, 91). Sin embargo, el status de funcionalidad hepática no solo queda reflejado en el volumen de bilis, si no también y, de forma más fiel, en la "calidad" de la misma. En este sentido el mejor índice de calidad biliar lo aporta la concentración de los lípidos biliares, especialmente los ácidos biliares, ya que estos constituyen el principal motor de la secreción biliar, influyendo en la síntesis y secreción

UNIVERSIDAD DE MURCIA

del resto de componentes biliares y por tanto, también en el volumen (55, 73, 74, 75, 81, 85, 86, 89, 90, 91). Basándonos en estas aportaciones, medimos diariamente en nuestros pacientes la concentración de los lípidos biliares (ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol) y las consideramos, junto al flujo o volumen biliar diario, marcadores precisos de funcionalidad hepática.

Para obtener muestras de bilis y medir los parámetros mencionados, tanto en el grupo control como en el de pacientes trasplantados, fue preciso la presencia de un tubo de Kehr en la vía biliar, que se comporta como una fístula biliar externa depleccionando la reserva de ácidos biliares y, por tanto, alterando la secreción biliar. Diversos autores (34, 60, 73, 76, 81, 85, 87) han demostrado que la derivación de la bilis al exterior (mediante un tubo de Kehr) conlleva una interrupción de la circulación enterohepátca de los ácidos biliares lo que produce una deplección rápida de la reserva hepática de los mismos. Los ácidos biliares secretados proceden, en gran medida, de dicha reserva, por lo que al disminuir esta, disminuirá su secreción (55, 73). Por ello, en los momentos iniciales de dicha interrupción, la concentración de ácidos biliares es muy baja, y dado que el flujo y la secreción lipídica biliar depende en gran medida de aquellos, aparecerán con valores muy bajos. No obstante, la disminución de la concentración de ácidos biliares en bilis y, por tanto, en sangre, va a producir un estímulo en el hepatocito para aumentar la síntesis y secreción de los mismos (60, 73, 76, 81, 85, 86). Los estudios de MYANT y HEBER (86) y, posteriormente, los de LANCINI (79), PANDAK (87) y VLAHCEVIC (76), demostraron la existencia de un "feed-back" negativo producido por los ácidos biliares sobre los enzimas **colesterol-7 alfa- hidroxilasa** y **HMG-CoA reductasa**, de forma que al caer la concentración de ácidos biliares, dichos enzimas se estimularían, aumentando la síntesis hepática de ácidos biliares, que a su vez estimularían la síntesis y secreción de los otros lípidos y, en definitiva, el flujo biliar. Conforme va aumentando la concentración de ácidos biliares se va controlando su síntesis, en virtud del "feed-back", normalizándose la misma. Este hecho ocurre al final de la primera semana postoperatoria en los pacientes intervenidos portadores de tubo de Kehr (73, 81).

Nuestro estudio reveló, en el grupo control, que el flujo y la concentración de lípidos biliares fueron muy bajos el primer día del postoperatorio, aumentando progresivamente hasta alcanzar valores similares al último día de obtención de bilis, al final de la primera semana.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Consideramos el último día (día 12° para el grupo control, en el que se retira el tubo de Kehr) como referencia ya que ha transcurrido el periodo de tiempo suficiente para que el hígado compense el efecto "fístula biliar externa" del tubo de Kehr y se estabilice la secreción biliar, alcanzando niveles de flujo y lípidos biliares semejantes a los pacientes sin tubo de Kehr (73). El hecho de que a partir del 5° día postoperatorio, los lípidos y el flujo biliar no mostrasen diferencias significativas respecto al día 12° (el colesterol a partir del día 8°) evidencia la estabilización de la secreción biliar al final de la 1ª semana postoperatoria. Las características físicas de la bilis también fueron modificándose desde el primer día postoperatorio, aumentando de forma progresiva la intensidad del color y la filancia, no mostrando cambios a partir del final de la primera semana postoperatoria, lo que evidencia una clara correlación con los cambios en la composición lipídica. Estos resultados coinciden con los obtenidos por PRANDI (73) y SCHERSTEN (81), y confirman la dependencia del flujo y secreción lipídica de la secreción y concentración biliar de ácidos biliares.

No se han encontrado diferencias significativas entre pacientes con y sin litiasis biliar en la composición lipídica biliar (64), lo que nos autoriza a considerar al grupo de coledocolitiasis como control. Tampoco existen diferencias significativas en cuanto al sexo respecto a la composición lipídica (62, 63), lo que nos permitió comparar grupos con predominio de uno u otro sexo.

La recogida de las muestras de bilis las realizamos siempre a la misma hora (a primera hora de la mañana, estando el paciente en ayunas), evitando las posibles alteraciones en la composición lipídica atribuidas al ritmo circadiano y a la ingesta previa inmediata (77, 87).

Finalmente, los métodos de determinación de los lípidos biliares utilizados en nuestro estudio han sido los empleados por otros grupos de investigadores, dada su precisión y fiabilidad (14, 73, 81, 89, 90, 91, 92).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

2.-PACIENTES CON TRASPLANTE ORTOTOPICO DE HIGADO. PAPEL DEL FLUJO Y LOS LIPIDOS BILIARES EN LA MONITORIZACION DEL INJERTO.

2.1.-¿Cual es el patrón normal de flujo y concentración lipídica biliar del injerto hepático?

Diversos investigadores han estudiado el perfil de la secreción lipídica y el flujo biliar en los pacientes con TOH, portadores de un tubo de Kehr (14, 34, 89, 90, 91, 92. Todos ellos describen una secreción biliar muy baja durante los primeros días del postoperatorio, con concentraciones de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares por debajo de los límites normales, que van a aumentar de forma progresiva, hasta alcanzar los niveles normales, a lo largo del postoperatorio. No obstante, difieren en establecer el momento en que esto se produce. WALDRAM et al. (34) describieron una disminución del flujo y de la concentración de lípidos biliares (sobre todo fosfolípidos y ácidos biliares, con hipersaturación relativa de colesterol) durante las primeras semanas del postoperatorio, atribuida a la presencia del tubo de Kehr, que interrumpía la circulación enterohepática de los ácidos biliares, y a la disminución de la capacidad sintética del hígado durante los episodios de rechazo acontecidos; sin embargo, no establecieron el patrón de secreción lipídica biliar normal de estos pacientes. HAAGSMA et al. (89) observaron que, durante las dos primeras semanas del postoperatorio, las concentraciones de lípidos biliares eran inferiores a las de pacientes no trasplantados (colecistectomizados por litiasis), aumentando en la 3ª semana, aunque sin alcanzar los niveles de los pacientes colecistectomizados. BOWERS et al. (90) evidenciaron que el flujo y las concentraciones de los tres lípidos biliares alcanzaban valores similares a la obtenidas en los pacientes no trasplantados portadores de un tubo de Kehr alrededor del 10° día postoperatorio, coincidiendo con el clampaje del tubo; es decir, imbricaron al tubo de Kehr como responsable de la baja secreción biliar. ERICZON et al. (14, 91) establecieron que la normalización de la secreción biliar y, por tanto, de las concentraciones de los tres lípidos biliares acontecía en la segunda semana, tiempo necesario para la recuperación del injerto de la lesión atribuida a la preservación del mismo. FAROUK et al. (92) objetivaron que la secreción biliar (flujo y concentraciones de lípidos

UNIVERSIDAD DE MURCIA

biliares) en los pacientes trasplantados alcanza valores similares a la de los no trasplantados (coledocolitiasis) durante la segunda semana postoperatoria.

Nuestro estudio mostró el perfil de secreción biliar en los pacientes trasplantados y evidenció el efecto de la preservación sobre el injerto durante la intervención, así como la alteración que produce la presencia del tubo de Kehr en la vía biliar. Como realizamos en el grupo control, tomamos como referencia los parámetros biliares obtenidos el último día de la obtención de bilis del tubo de Kehr o día del clampaje del tubo, (día 18, en el grupo de pacientes trasplantados), dando tiempo al injerto a la recuperación de la lesión por la preservación y del efecto "fístula biliar externa" producido por el tubo de Kher. Observamos que el flujo biliar adquiría valores similares al día del clampaje del tubo a partir del 10° día postoperatorio y, de forma similar, la concentración de colesterol y la de fosfolípidos. Sin embargo, aunque la concentración de ácidos biliares pronto mostró valores próximos a los del último día, el estudio comparativo con el grupo control (no sometido a la lesión por la preservación), mostró que la recuperación del injerto acontece alrededor del día 16° postoperatorio, es decir durante la 3ª semana del postoperatorio. Estos resultados constatan que, en los pacientes trasplantados, la adquisición de los valores normales de los parámetros biliares ocurre unos 10 días más tarde que en el grupo control, hecho debido a la isquemia sufrida por el injerto en su preservación. Otros autores (14, 90, 91, 92) describen una recuperación más precoz del injerto, mientras que HAAGSMA et al. (89) evidencian que los pacientes trasplantados no llegan a alcanzar las concentraciones de lípidos biliares obtenidas en los pacientes con colelitiasis, al menos durante las 3 primeras semanas del postoperatorio.

2.2.-¿Como afectan al flujo y a la secreción lipídica biliar las complicaciones del injerto?

2.2.1.-FALLO PRIMARIO DEL INJERTO.

Esta complicación fue la que mostró el flujo biliar y las concentraciones de lípidos biliares más bajas de todas. Por ello, podemos decir que la disfunción o fallo primario del injerto se traduce en una pérdida total de su función sintética y excretora desde el primer día

UNIVERSIDAD DE MURCIA

postoperatorio. Nuestro estudio se reveló muy útil para el diagnóstico de esta complicación, dada la inespecificidad de los parámetros analíticos del perfil hepático, que pueden permanecer alterados durante los primeros días del postoperatorio sin que traduzcan, necesariamente, alguna complicación. Aunque el escaso flujo nos indique la posibilidad de que haya acontecido esta alteración, son las bajas (casi nulas) concentraciones de ácidos biliares, fosfolípidos, y colesterol las que nos acercan al diagnóstico. No obstante, para establecer el diagnóstico de esta complicación es preciso evidenciar, junto a los parámetros clínico-analíticos que indican disfunción hepática, la existencia de un flujo vascular normal mediante Eco-doppler y arteriografía hepática y, finalmente, realizar una biopsia. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por ERICZON et al. (14, 91), que demostraron la pérdida de la capacidad sintética y secretora del injerto, manifestada por las bajas concentraciones de lípidos en bilis, en un paciente trasplantado que presentó fallo primario y falleció.

2.2.2.-SEPSIS

Es un hecho constatado en la literatura que los episodios de sepsis, independientemente de su origen, pueden conllevar colestasis hepática (151). Esta complicación se objetivó en tres de nuestros pacientes trasplantados, que manifestaron una caída simultánea de las concentraciónes de los tres lípidos biliares, mientras que los marcadores séricos de colestasis se elevaron. Sin embargo, el flujo biliar no mostró cambios significativos, probablemente porque dichos episodios no alcanzaron la severidad necesaria para producirlos. Es decir, los lípidos biliares se revelaron como buenos marcadores de la función hepática, más sensibles que las variaciones del flujo biliar, aunque no aportaron más información que los test analíticos séricos habituales para el diagnóstico de sepsis.

2.2.3.-RECHAZO.

A mediados de los años 70, WALDRAM (34) describió cambios en la composición lipídica biliar en los pacientes con trasplante hepático, durante los episodios de rechazo, con una disminución de los ácidos biliares y fosfolípidos y algo menos del colesterol. No obstante,

UNIVERSIDAD DE MURCIA

el escaso número de pacientes estudiados y la no determinación de las concentraciones de los lípidos de forma continuada en el postoperatorio, no permitieron obtener resultados valorables. Posteriormente HAAGSMA et al. (89) monitorizaron las concentraciones de los tres lípidos biliares en los pacientes trasplantados, evidenciando una caída súbita de las mismas durante los episodios de rechazo. Resultados similares obtuvieron ERICZON et al (14, 91), que describieron una disminución de la concentración del colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares, simultáneamente, durante los episodios de rechazo, así como una recuperación inmediata con la instauración del tratamiento. No obstante, estos autores describen una disminución similar de las concentraciones durante otras complicaciones, como la trombosis de la arteria hepática (90, 91). Observaron que la mayor utilidad de la monitorización de los lípidos biliares radicó en la valoración precoz de la eficacia del tratamiento antirrechazo, pues los parámetros biliares se normalizaban antes que el perfil hepático sérico.

Nuestros resultados, de forma similar a los obtenidos por ERICZON et al. (14, 91) y HAAGSMA et al. (89), demuestran una caída significativa del flujo biliar y de las concentraciones de fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares y, de forma simultánea, elevación de las transaminasas, bilirrubina total y fosfatasa alcalina, durante los episodios de rechazo. También observamos una normalización más rápida de los parámetros biliares que de los séricos con el tratamiento antirrechazo. No obstante, no obtuvimos diferencias significativas en las concentraciones de los tres lípidos respecto a los pacientes trasplantados con sepsis, lo que evidencia que cualquier proceso que afecte al injerto de forma importante conllevará una disminución de las concentraciones de los lípidos biliares, restando especificidad al método, tal y como refieren BOWERS (90) y ERICZON (91). Por otro lado, la medida de las concentraciones de los lípidos biliares no aportó mayor eficacia en la detección del rechazo que los test séricos habituales, por lo que no consideramos necesario introducir este método en los protocolos diagnósticos del paciente trasplantado para la detección precoz de las complicaciones del injerto.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

V.-CONCLUSIONES

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

A) Respecto a la Citología Biliar:

1) En los pacientes portadores de un tubo de Kehr tras ser intervenidos por coledocolitiasis, sin complicaciones, la citología biliar evidencia una alta densidad celular el primer día del postoperatorio, que va decreciendo paulatinamente, hasta desaparecer al 5º día postoperatorio. La composición celular la constituyen mayoritariamente leucocitos PMN y, en menor abundancia, células epiteliales. Los macrófagos y las células mononucleadas fueron muy escasos y no se objetivaron blastos.

2) En los pacientes con trasplante ortotópico de hígado, el efecto producido por la preservación del injerto durante la intervención no influye en la densidad celular biliar, aunque sí en la composición celular, lo que se evidencia por una mayor presencia de células epiteliales y células "fantasma" en las extensiones celulares.

3) En nuestra experiencia, el análisis citológico biliar seriado constituye un método adicional de diagnóstico precoz de las complicaciones del injerto, fundamentalmente el rechazo y la sepsis. La presencia de blastos en las extensiones es un signo patognomónico de rechazo.

B) Respecto al Flujo y a la Composición Lipídica Biliar:

1) La derivación externa de la bilis, producida por el tubo de Kehr, ocasiona deplección en la reserva de ácidos biliares, responsables de gran parte de la secreción biliar, lo que conlleva una escasa secreción de lípidos biliares y una

UNIVERSIDAD DE MURCIA

disminución del volumen de bilis durante los 5 primeros días del postoperatorio, normalizándose los mismos a partir del 5º día postoperatorio, excepto el colesterol que se normaliza a partir del 8º.

2) En el trasplante hepático, se produce un retraso en la normalización de la secreción biliar, hecho que acontece en la 3ª semana postoperatoria.

3) Las concentraciones de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares, así como el volumen o flujo biliar, pueden ser útiles en el diagnóstico de las complicaciones del hígado trasplantado. En nuestra experiencia, las complicaciones del injerto hepático, tales como el fallo primario, el rechazo y la sepsis, provocan una disminución de la concentración de los lípidos biliares y, excepto en la sepsis, del volumen de bilis secretado.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

VI.-BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

1.-WELCH C.S.
A note on transplantation of the whole liver in dogs.
TRANSPLANT. BULL 1955; 2: 54-55.

2.-CANNON J.A.
TRANSPLANT. BULL 1956; 3: 7.

3.-MOORE F.D., WHEELER H.B., DEMISSIANOS H.V. et al.
Experimental whole-organ transplantation of the liver and of the spleen.
ANN. SURG. 1960; 152: 374-387.

4.-STARZL T.E., KANPP H.A., BROCK D.R. et al.
Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow.
SURG. GYNECOL. OBSTET. 1960; 111: 733-743.

5.-STARZL T.E., MARCHIORO T., VON KAULLAK et al.
Homotransplantation of the liver in humans.
SURG. GYNECOL. OBSTET. 1963; 117: 659-676.

6.-CALNE R., WILLIAMS R.
Liver transplantation in man. Observations on technique and organization in five cases.
BR. MED. J. 1968; 4: 535-540.

7.-STARZL T.E., PUTNAM C.
Experience in hepatic transplantation.
FILADELFIA: SAUNDERS 1969; 92-98.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

8.-BOREL J.
Effects of the new antilynphocytic peptide Cyclosporine A in animals.
INMUNOLOGY 1977; 32: 1017-1025.

9.-CALNE R.
Cyclosporin A initially as the only inmunosupressant in 34 patient of cadaveric organs: 32 kidney, 2 pancreas and 2 livers.
LANCET 1979; ii: 1033-1036.

10.-STARZL T.E.
Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone.
N. ENG. J. MED. 1981; 305: 266-269.

11.-National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver transplantation. June 20-23, 1983.
HEPATOLOGY 1983; Suppl: 107 s-110 s.

12.-MARGARIT C., JAURRIETA E., MAESTRE P. et al.
Trasplante hepático ortotópico en un paciente con hepatocarcinoma.
REV. ESP. ENF. AP. DIG. 1984; 66: 234-239.

13.-KUBOTA K., ERICZON B.G., BARKHOLT L. et al.
Bile cytology in orthotopic liver transplantation.
TRANSPLANTATION 1989; 48: 998-1003.

14.-ERICZON B.G., EUSUFZAI S., KUBOTA K. et al.
Characteristics of Biliary Lipid Metabolism after Liver Transplantation.
HEPATOLOGY 1990; 12:1222-1228.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

15.-RIMOLA A.
Indicaciones del trasplante hepático.
En: FERNANDEZ CRUZ L. Trasplante de Organos. BARCELONA: SALVAT 1991; 46-50.

16.-DONOVAN J., ZETTERMAN R., BURNETT D. et al.
Preoperative evaluation, preparation, and timing of orthotopic liver transplantation in the adult.
SEMIN. LIVER DIS. 1989; 9: 168-175.

17.-RAMIREZ P., SANCHEZ BUENO F., PONS J. A. et al.
Problemática del receptor en el trasplante hepático (I): Indicaciones y valoración preoperatoria.
ANALISIS CLINICOS 1991; 63-II: 92-98.

18.-MORENO E., GARCIA I., GONZALEZ I. et al.
Trasplante hepático ortotópico: Resultados del Hospital "12 de Otubre".
REV. ESP. ENF. DIGEST. 1990; 78: 295-302.

19.-DINDZANS V.J., SCHADE R.R., VAN THIEL D.H.
Medical Problems before and after transplantation.
CLIN. NORTH AM. 1988; 17: 19-33.

20.-STARZL T.E., DEMETRIS A.J., VAN THIEL D.H.
Liver transplantation (First of two parts).
NEW ENG. J. MED. 1989; 321: 1014-1022.

21.-TURRION V.S., VICENTE E., NUÑO J. et al.
Complicaciones no inmunológicas del injerto.
En: CUERVAS-MONS V. Trasplante Hepático. BARCELONA: MAYO S.A. 1993; 73-84

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

22.-STARZL T.E., DEMETRIS A.J.
Liver transplantation: A 31-year perspective. Part I.
CURRENT PROBLEMS IN SURGERY 1990; 51-116.

23.-AGNES S., AVOLIO L.W., MAGALINI S.C. et al.
Is primary non function still a suitable indication for liver retransplantation?
TRANSPLANT. PROC. 1991; 23: 2261-2262.

24.-TZAKIS A.G., GORDON R.D., SHAW B.W. Jr. et al.
Clinical presentation of hepatic artery thrombosis after liver transplantation in the cyclosporine era.
TRANSPLANTATION 1985; 40: 667-671.

25.-SHAW B.W. Jr., IWATSUKI S., STARZL T.E.
Alternative methods of arterialization of the hepatic graft.
SURG. GYNECOL. OBSTET. 1984; 159: 490-494.

26.-TODO S., MAKOWKA L., TZAKIS A.G. et al.
Hepatic artery in liver transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1987; 19: 2406-2411.

27.-GRENVIK A., GORDON R.
Postoperative care and problems in liver transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1987; 19: 26-33.

28.-LERUT J., TZAKIS A.G., BRON K. et al.
Complications of venous reconstruction in human orthotopic liver transplantation.
ANN. SURG. 1987; 205: 404-414.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

29.-PARRILLA P., SANCHEZ BUENO F., RAMIREZ P. et al.
Urokinasa locorregional en trombosis de la vena cava inferior, postrasplante ortotópico de hígado.
CIR. ESP. 1990; 48: 212-216.

30.-KROM R.A.F., KINGMA L.M., HAAGSMA E.B. et al.
Choledochostomy: A relatively safe procedure in orthotopic liver transplantation.
SURGERY 1985; 97: 552-556.

31.-VICENTE E., PERKINS J.D., STERIOFF S. et al.
Biliary tract complications following orthotopic liver transplantation.
CLIN. TRANSPLANTATION 1987; 1: 138-142.

32.-LERUT J., GORDON R.D., IWATSUKI S.H. et al.
Biliary tract complications in human orthotopic liver transplantation.
TRANSPLANTATION 1987; 43: 47-51.

33.-RAMIREZ P., PARRILLA P., SANCHEZ BUENO F. et al.
Las reintervenciones debidas a complicaciones de la vía biliar tras el trasplante hepático ortotópico.
BR. J. SURG. 1993; 80: 1426-1428.

34.-WALDRAM R., WILLIAMS R., CALNE R.Y.
Bile composition and bile cast formation after transplantation of the liver in man.
TRANSPLANTATION 1975; 19: 382-387.

35.-MEDAWAR P.B.
The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits.
J. ANAT. 1944; 78: 176-199.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

36.-MADDREY W.C., VAN THIEL D.H.
Liver transplantation: An overview.
HEPATOLOGY 1988; 8: 948-959.

37.-STARZL T.E., DEMETRIS A.J.
Liver transplantation: A 31-year perspective. Part II.
CURRENT PROBLEMS IN SURGERY 1990; 118-178.

38.-MARGARIT C.
Rechazo del injerto hepático.
En: CUERVAS-MONS V. Trasplante Hepático. BARCELONA: MAYO S.A. 1993; 107-120.

39.-ASCHER N.L.
Rejection of the transplanted liver.
In: MADDREY W.C. Transplantation of the liver. N. YORK: ELSEVIER 1988; 167-190.

40.-ROBERTI I., LIEBERMAN K.V., MANZARBEITIA C. et al.
Evidence that the systematic analysis of bile cytology permits monitoring of hepatic allograft rejection.
TRANSPLANTATION 1992; 54: 471-474.

41.-COLINA F.
Patología y trasplante hepático: diagnóstico anatomopatológico del rechazo.
PATOLOGIA 1988; 21:147-156.

42.-KEMNITZ J., RINGE B., COHNERT T.R. et al.
Bile duct injury as a part of diagnostic criteria for liver allograft rejection.
HUMAN PATHOL. 1989; 20: 132-143.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

43.-SNOVER D.C., SIBLEY R.K., FREESE D.K. et al.
Orthotopic liver transplantation: A pathological study of 63 serial lliver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection.
HEPATOLOGY 1984; 4: 1212-1222.

44.-SNOVER D.C., FREESE D.K., SHARP H.L. et al.
Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy indetermining outcome of rejection.
AM. J. SURG. PATHOL. 1987; 11: 1-10.

45.-LAUTENSCHLAGER I., HOCKERSTEDT K., AHONEN J. et al.
Fine needle aspiration biopsy in the monitoring of liver allografts.
TRANSPLANTATION 1988; 46: 47-52.

46.-VAN HOEK B., WIESNER R.H., LUDWIG J. et al.
Recurrence of ductopenic rejection in liver allografts after retransplantation for vanishing bile duct syndrome.
TRANSPLANT. PROC. 1991; 23: 928-930.

47.-FREESE D.K., SNOVER D.C., SHARP H.L. et al.
Chronic rejection after liver transplantation. a study of clinical histopathological and inmunological feature.
HEPATOLOGY 1991; 13: 882-891.

48.-KUSNE S., DUMMER J.S., SINGH N. et al.
Infections after liver transplantation. An analysis of 101 consecutive cases.
MEDICINE (Baltimore) 1988; 67: 132-143.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

49.-BENEDICT L.M., KUSNE S., TORRECISNEROS J. et al.
Primary cutaneous fungal infection after transplantation; a report of five cases and review of the literature.
CLIN. INFECT. DIS. 1992; 15: 17-21.

50.-STARZL T.E., DEMETRIS A.J.
Liver transplantation: A 31-year perspective. Part III.
CURRENT PROBLEMS IN SURGERY 1990; 183-240.

51.-RIZZETTO M., RECHIA S., SALIZZONI M.
Liver transplantation in carriers of the HBs Ag.
J. HEPATOL. 1991; 13: 5-7.

52.-POTERUCHA J.J., RAKELA J., LUDWIG J. et al.
Hepatitis C Antibodies in patients with chronic hepatitis of unknown etiology after liver transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1991; 23: 1495-1497.

53.-TORRE-CISNEROS J., DE LA MATA M., VARO E. et al.
Complicaciones infecciosas del trasplante hepático.
En: CUERVAS-MONS V. Trasplante Hepático. BARCELONA: MAYO S.A. 1993; 121-140.

54.-VAN THIEL D.H., DINDZANS V.J., GAVALER J.S. et al.
Extrahepatic disease in liver transplant recipients.
TRANSPLANT. PROC. 1989; 21: 3478-3481.

55.-COLEMAN R., RAHMAN K.
Lipid flow in bile formation.
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1992; 1125: 113-133.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

56.-SCHAFFNER F., POPPER H.
Estructura del hígado.
En: EDWARD BERK. Gastroenterología. FILADELFIA: SAUNDERS 1987; 2873-2908.

57.-ITOSHIMA T., KIYOTOSHI S., KAWAGUCHI K. et al.
Scanning electron microscopy of the rat bile canalicular-ductular function.
SCAN. ELECTRON MICROSC. 1980; 3: 373-378.

58.-ERLINGER S.
Bile flow.
In: ARIAS I.M., POPPER H., SCHACHTER D., SHAFRITZ D.A. The Liver: Biology and Pathobiology. NEW YORK: RAVEN PRESS 1982; 407-427.

59.-KOSS L.G.
Cytology of bile.
In: KOSS L.G. Diagnostic Cytology and its Histopathologic Basis. 3rd ed. PHILADELPHIA. PENNSYLVANIA.: J.B. LIPPINCOTT 1975; 868-877.

60.-DOWLING R.H., MACK E., SMALL D.M.
Biliary lipid secretion and bile composition after acute and chronic interruption of the enterohepatic circulation in the rhesus monkey.
J. CLIN. INVEST. 1971; 50: 1917-1926.

61.-FISHER M.M., YOUSEF I.M.
Sex diferences in the bile acid composition of human bile: Studies in patients with and without gallstones.
CAN. MED. ASSOC. J. 1973; 109: 190-193.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

62.-THUREBORN E.
Human hepatic bile: Composition changes due to altered enterohepatic circulation.
ACTA CHIR. SCAND. 1962; 303: 1-63.

63.-VAN DER LINDEN W., NORMAN A.
Composition of human hepatic bile.
ACTA CHIR. SCAND. 1967; 133: 307-313.

64.-SHAFFER E.A., BRAASCH J.W., SMALL D.M.
Bile composition at and after surgery in normal persons and patients with gallstones.
N. ENGL. J. MED. 1972; 287: 1317-1322.

65.-ARONCHICK C.A., BROOKS F.P.
Anatomía y fisiología del aparato biliar.
En: EDWARD BERK J. Gastroenterología. FILADELFIA: SAUNDERS 1987; 3759-3800.

66.-GOTTFRIES A.S., NILSSON B., SAMUELSSON B. et al.
Phospholipids in human hepatic bile, gallblader bile and plasma in cases with acute cholecystitis.
SCAND. J. CLIN. LAB. INVEST. 1968; 21: 168-176.

67.-BOUCHIER I.A.D., CLAM J.R.
Glicoproteins in human bile.
CLIN. CHIM. ACTA 1971; 35: 219-224.

68.-BODEC J.C., ZELDER O., NEUBERGER H.O.
Effect of taurocholate, dehydrocholate and secretion on biliary output of alkaline phosphatase and GOT.
HELV. MED. ACTA 1973; 37: 143.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

69.-METZGER A.L., ADLER R., HEYMSFIELD S. et al.
Diurnal variation in biliary lipid composition: possible role in cholesterol gallstone formation.
N. ENGL. J. MED. 1973; 288: 333-336.

70.-ANDERSON A., JAMES O.F.W., MAC DONALD H.S. et al.
The effect of ethinyl oestradiol on biliary lipid composition in young men.
EUR. J. CLIN. INVEST. 1980; 10: 77-81.

71.-BENNION L.J., MOTT D.M., HOWARD B.V.
Oral contraceptives raise the cholesterol saturation of bile by increasing biliary cholesterol secretion.
METABOLISM 1980; 29: 18-22.

72.-DEN BESTEN L., COONNOR W.E., BELL S.
The effect of dietary cholesterol on the composition of human bile.
SURGERY 1973; 73: 266-273.

73.-PRANDI D., ERLINGER S., GLASINOVIC J.C., et al.
Canalicular bile production in man.
EUR. J. CLIN. INVEST. 1975; 5: 1-6.

74.-BOYER J.L., ITABASHI M., HRUBEN Z.
Formation of pericanalicular vacuoles during sodium dehydrocholate choleresis. A mechanism for bile salts transport.
In: PREISIG R., BIRCHE J. The liver: Quantitative Aspects of Structure and Function. BASEL: KARGER 1979; 163-167.

75.-BLITZER B.L., BOYER J.L.
Cytochemical localization of Na^+, K^+ ATPase in the rat hepatocyte.
J. CLIN. INVEST. 1978; 62: 1104-1108.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

76.-VLAHCEVIC Z.R., HEUMAN D.M., HYLEMON P.B.
Regulation of bile acid synthesis.
HEPATOLOGY 1991; 13: 590-600.

77.-DANIELSSON H.
Relationship between diurnal variations in biosynthesis of cholesterol and bile acids.
STEROIDS 1972; 20: 63-79.

78.-COWEN A.E., KORMAN M.G., HOFMANN A.F.
Metabolism of lithocholic acid in man.
GASTROENTEROLOGY 1974; 67: 785.

79.-LANZINI A., NORTHFIELD T.C.
Biliary lipid secretion in man.
EUR. J. CLIN. INVEST. 1991; 21: 259-272.

80.-GRUNDY S.M., METZGER A.L.
A physiological method for the estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man.
GASTROENTEROLOGY 1972; 62: 1200-1217.

81.-SCHERSTEN T., NILSSON S., CAHLIN E. et al.
Relationship between the biliary excretion of bile acids and the excretion of water, lecithin, and cholesterol in man.
EUR. J. CLIN. INVEST. 1971; 1: 242-247.

82.-KAMINSKI D.L., DESHPANDE Y.G.
Effect of gastrin I and gastrin II on canine bile flow.
AM. J. PHYSIOL. 1979; 232: E 584.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

83.-CHENDEROVITCH J.
Secretory function of the rabbit common bile duct.
AM. J. PHYSIOL. 1972; 223: 695-706.

84.-FRITZ M.E., BROOKS F.B.
Control of bile flow in the cholecystectomized dog.
AM. J. PHYSIOL. 1963; 204: 825-828.

85.-ERIKSSON S.
Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rats.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1957; 94: 578-582.

86.-MYANT N.B., HEBER H.A.
The effect of biliary drainage upon the synthesis of cholesterol in the liver.
J. LIPID. RES. 1961; 2: 363-368.

87.-PANDAK W.M., HEUMAN D.M., HYLEMON P.B. et al.
Regulation of bile acid synthesis. V. Inhibition of conversion of 7-dehidrocholesterol to cholesterol is associated with down-regulation of cholesterol 7-hidroxilasa activity and inhibition of bile acid synthesis.
J. LIPID. RES. 1990; 31: 2149-2158.

88.-STARZL T.E., IWATSUKI S., VAN THIEL D.H. et al.
Evolution of liver transplantation.
HEPATOLOGY 1982; 2: 614-636.

89.-HAAGSMA E.B., HUIZENGA J.R., VONK R.J. et al.
Composition of bile after orthotopic liver transplantation.
SCAND. J. GASTROENTEROL. 1987; 22. 1049-1055.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

90.-BOWERS B.A., ROTOLO F.S., WATTERS C.R. et al.
Regulation of Biliary Secretion following Liver Transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1989; 21: 3554.

91.-ERICZON B.G., EUSUFZAI S., KUBOTA K. et al.
Biliary lipid secretion early after liver transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1990; 22: 1537-1538.

92.-FOROUK M., BRANUM G.D., WATTERS C.R. et al.
Bile compositional changes and cholesterol stone formation following orthotopic liver transplantation.
TRANSPLANTATION 1991; 52: 727-730.

93.-BRUNJES D., HARDT C., ROLLINGHOFF M. et al.
Cyclosporin mediates inmunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the realease of interleukin 1 and interleukin 2.
EUR. J. IMMUNOL. 1981; 11: 657-661.

94.-JANCO R.L., ENGLISH D.
Cyclosporine and human neutrophil function.
TRANSPLANTATION 1983; 35: 501-503.

95.-THOMPSON A.W., DEBORAH K., MOON C. et al.
Cyclosporin A inhibits lymphokine production but not the response of macrophagues to linphokines.
INMUNOLOGY 1983; 48: 291-299.

96.-STARZL T.E., KLINTMALM G.B., WEIL R. III et al.
Cyclosporin A and steroid therapy in sixty-six cadaver kidney recipients.
SURG. GYNECOL. OBSTET. 1981; 153: 486-494.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

97.-KLINTMALM G.B., IWATSUKI S., STARZL T.E.
Cyclosporin A hepatotoxicity in 66 renal allograft recipients.
TRANSPLANTATION 1981; 32: 488-489.

98.-SCHADE R.R., GUGLIELMI A., VAN THIEL D.H. et al.
Cholestasis in heart transplant recipients treated with cyclosporin.
TRANSPLANT. PROC. 1983; 15: 2557-2560.

99.-ROTOLO F.S., BRANUM G.D., BOWERS B.A. et al.
Effect of cyclosporine on the bile secretion in rats.
AM. J. SURG. 1986; 151: 35-40.

100.-STONE B.G., UDANI M., SANGHVI A. et al.
Cyclosporine A-induced cholestasis: the mechanism in the rat model.
GASTROENTEROLOGY 1987; 93: 344-351.

101.-LE THAI B., DUMONT M., MICHEL A. et al.
Cholestatic effect of cyclosporine in the rat.
TRANSPLANTATION 1988; 46: 510.

102.-ROMAN I.D., MONTE J.M., GONZALEZ BUITRAGO J.M. et al.
Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporine A in the rat: relationship with cholestasis and hiperbilirrubinemia.
HEPATOLOGY 1990; 12: 83-91.

103.-THEILMAN L., OTTO G., ARNOLD J. et al.
Biliary secretion of bile acids, lipids, and bilirrubin by the transplanted liver.
TRANSPLANTATION 1991; 52: 1020-1023.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

104.-BURNETT W., GAIRNS F.W., BACSICH P.
Some observations on the innervation of the extrahepatic biliary system in man.
ANN. SURG. 1964; 159: 8-26.

105.-YAMATANI K., SATO M., TAKAHASHI K. et al.
Dissociation of the alpha-adrenergic inhibitory effect on glucagon and secretin-stimulated bile volume and on cyclic adenosin monophosphate production in the isolated perfused rat liver.
ENDOCRINOLOGY 1985; 116: 1694.

106.-LEUZEN R., FUNK A., GEH B. et al.
Alpha-adrenergics inhibit the bile flow throug portal vasoconstriction.
ZEITSCHRIFT FUR GASTROENTEROLOGIE 1987; 25: 9.

107.-CUCCHIARO G., BRANUM G.D., FAROUK M. et al.
The effects of liver denervation on the regulation of hepatic biliary secretion.
TRANSPLANTATION 1992; 54: 129-136.

108.-LEMON H.M., BYRNES W.W.
Cancer of the biliary tract and pancreas: diagnosis from cytology of duodenal aspirations.
JAMA 1949; 141: 254-257.

109.-NIEBURGS H.E., DREILING D.A., RUBIO C. et al.
The morfology of cells in duodenal drainage smears, histologic origin and pathologic significance.
AM. J. DIG. DIS. 1967; 7: 489-505.

110.-SHERLOCK P., KIM Y.S., KOSS L.G.
Cytologic diagnosis of cancer from aspirated material obtained at liver biopsy.
AM. J. DIG. DIS. 1967; 12: 396-402.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

111.-GROSSMAN E., GOLDSTERIN M.J., KOSS L.G. et al.
Cytological examination as an adjunct to liver biopsy in the diagnosis hepatic metastases.
GASTROENTEROL. 1972; 62: 56-60.

112.-MARTIN H.E., ELLIS E.B.
Biopsy by needle puncture and aspiration.
ANN. SURG. 1930; 92: 169-181.

113.-STEWAR F.W.
The diagnosis of tumors by aspiration.
AM. J. PATHOL. 1933; 9: 801-812.

114.-FIESSINGER N., ARNAUDET A., LAUR C.M.
L`hepatogramme en clinique courante, en particulier dans le diagnostic du cancer du foie.
SANG. 1938; 12: 103.

115.-WEIL P.E., ISCH-WALL P., PERLES S.
La ponction du foie dans la maladie du sang.
PRESSE MED. 1938; 46: 1707.

116.-HATIEGANU I., SPARCHEZ T., RADU P. et al.
Die Wert der Leberpunktion in der diagnose der verschiedenen Lebererkrankungen.
WIEN. KLIN. WSCHR. 1943; 56: 21.

117.-LOPEZ CARDOZO P.
Clinical cytology.
STAFLEN, LEYDEN 1954.

UNIVERSIDAD DE MURCIA
DOCTORADO
COMISION GENERAL

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

118.-BOCK H.E.
Lebercytologie.
Internationales symposium über klinische cytodiagnostik.
GEORG THIEME, STUTTGART 1958.

119.-NIEBURGS H.E., PARETZ A.D., PEREZ V. et al.
Cytologc study of liver smears and its clinical value.
Trans Seventh Annual Meeting of Inter Society Cytology Coouncil, 1959.

120.-SODERSTOM N.
Fine needle aspiration biopsy.
GRUNE & STRATTON, NEW YORK 1966.

121.-LUNDQUIST A.
Fine-needle aspiration biopsy for cytodiagnosis of malignant tumor in the liver.
ACTA MED. SCAND. 1970; 188: 465-470.

122.-WASASTJERNA C., EKELUND P., HALTIA K.
The bile canaliculi in cytological aspiration biopsy from patients with liver disorders.
SCAND. J. GASTROENT. 1970; 5: 327-331.

123.-LUNDQUIST A.
Fine-needle aspiration biopsy of the liver. Applications in clinical diagnosis and investigation.
ACTA MED. SCAND. 1971; 520: 5-26.

124.-DOMINIS M., CERLEK S., SOLTER D.
Cytology of diffuse liver disorders.
ACTA CYTOL. 1973; 17: 205-208.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

125.-CARNEY C.N.
Clinical cytology of the liver.
ACTA CYTOL. 1975; 19: 244-250.

126.-PROLLA J.C., KIRSNER J.B.
Handbook and Atlas of Gastrointestinal Exfoliative Cytology.
CHICAGO: UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS 1972.

127.-WERTLAKE P.T., DEL GUERCIO L.R.M.
Cytopathology of intra-hepatic bile as component of integrated procedure ("Minilap") for hepatobiliary disorders.
ACTA CYTOL. 1976; 20: 42-45.

128.-HARADA H., SASAKI T., YAMAMOTO N. et al.
Assessment of endoscopic aspiration cytology and endoscopic retrograde cholangio pancreatography in patients with cancer of the pancreas.
GASTROENTEROL. JPN 1977; 12: 52-58.

129.-COHAN R.H., ILLESCAS F.F., NEWMAN G.E. et al.
Biliary citodiagnosis. Bile sampling for cytology.
INVEST. RADIOL. 1985; 20: 177-179.

130.-DALTON-CLARKE H.J., PEARSE E., KRAUSZ T. et al.
Fine needle aspiration cytology and exfoliative biliary cytology in the diagnosis of hiliar cholangiocarcinoma.
EUR. J. SURG. ONCOL. 1986; 12: 143-145.

131.-DAVIDSON B.R., VARSAMIDAKIS N., DOOLEY J.S. et al.
The value of exfoliative cytology for investigating bile duct strictures.
GUT 1992; 33: 1408-1411.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

132.-PUGLIESE V., BARONE D., SACCOMANNO S. et al.
Tissue sampling from the common bile duct through endoscopic retrograde cholangiopancreatography, endoscopic papillotomy and drainage in juxtapapillary malignances.
SURG. ENDOSC. 1987; 1: 83-87.

133.-VENU R.P., GEENEN J.E., KINI M. et al.
Endoscopic Retrograde Brush Cytology. A new technique.
GASTROENTEROLOGY 1990; 99: 1475-1479.

134.-REINHOLT F.P., TYDEN G., BOHMAN S.O. et al.
Pancreatic juice cytology in the diagnosis of pancreatic graft rejection.
CLIN. TRANSPLANTATION 1988; 2: 127-133.

135.-KUBOTA K., REINHOLT F.P., TYDEN G. et al.
Recent experience with pancreatic juice cytology in monitoring pancreatic graft rejection.
TRANSPLANT. PROC. 1989; 21: 3643-3645.

136.-OLDHAFER K.J., GUBERNATIS G., RINGE B. et al.
Experience with bile cytology after liver transplantation.
TRANSPLANT. PROC. 1990; 22: 1524.

137.-STAAB E.V., JAQUES P.F., PARTAIN C.L.
Pecutaneous biopsy in the management of solid intraabdominal masses of unknown etiology.
RADIOL. CLIN. NORTH AM. 1979; 17: 535-560.

138.-SACHDEVA R., KLINE T.S.
ABC and special stains.
ACTA CYTOL. 1981; 25: 678-683.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

139.-KURZAWINSKI T., DEERY A., DAVIDSON B.R.
Diagnostic value of cytology in biliary stricture.
BR. J. SURG. 1993; 10: 51-60.

140.-KUBOTA K., REINHOLT F.P.
Our experience with bile cytology and pancreatic juice cytology.
TRANSPLANTATION 1990; 50: 722-723. (Letter).

141.-SEINER E., KLIMA G., NIEDERWIESER D. et al.
Monitoring of the pancreatic allograft by analysis of exocrine secretion.
TRANSPLANT. PROC. 1987; 19: 2336-2338.

142.-TYDEN G., REINHOLT F., BRATTSTROM G. et al.
Diagnosis of rejection in recipients of pancreatic grafts with enteric exocrine diversion by monitoring pancreatic juice cytology and amylase excretion.
TRANSPLANT. PROC. 1987; 14: 3892-3894.

143.-REINHOLT F.P., KUBOTA K., BARKHOLT L. et al.
Diagnosis of liver rejection by bile cytology: a case report.
CLIN. TRANSPLANT. 1989; 3: 359-363.

144.-KUBOTA K., ERICZON B.G., REINHOLT F.P.
Diagnosis of liver transplant rejection by bile cytology.
TRANSPLANT. PROC. 1990; 22: 1521-1523.

145.-DIETZE O., KLIMA G., KONIGSRAINER A. et al.
Bile cytology versus pancreatic juice cytology for diagnosis of allograft rejection.
TRANSPLANTATION 1990; 50: 721-722. (Letter).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

146.-KUBOTA K., ERICZON B.G., REINHOLT F.P.
The correlation between cytological patterns in bile and histological findings in liver transplantation.
TRANSPLANTATION 1992; 53: 791-795.

147.-GROTH C.G., PORTER K., OTTE J.B. et al.
Studies of blood flow and ultraestructural changes in rejecting and non rejecting canine orthotopic liver homografts.
SURGERY 1968; 63: 658-668.

148.-PORTER K.A.
Pathology of liver transplantation.
TRANSPLANT. REV. 1969; 2: 129-170.

149.-VIERLING J.M., FENNELL R.H. Jr.
Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: Evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts.
HEPATOLOGY 1985; 5: 1076-1082.

150.-LEOPOLD J.G.
A change in the sinusoid-trabecular structure of the liver with hepatic venous outflow block.
J. PATHOL. 1970; 100: 87.

151.-O´BRIEN M.J., GOTTLIEB L.S.
Hígado y vías biliares.
En: ROBBINS S.L., COTRAN R.S. Patología Estructural y Funcional. MADRID: INTERAMERICANA 1984; 935-1011.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

152.-LAUTENSCHLAGER I., HOCKERSTEDT K., HAYRY P.

Activation markers in acute liver allograft rejection.

TRANSPLANT. PROC. 1988; 20: 646.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

VII.-TABLAS Y FIGURAS

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

TABLA I. Parámetros analíticos del **perfil hepático** correspondientes al **grupo control** (coledocolitiasis) durante los 12 primeros días del postoperatorio. (x: media; e: error estándar; V.N.: valores normales de nuestro laboratorio).

	PREOP	Día 1	3	5	7	9	12	V.N.
GOT x	47.6	35.4	26.6	36.9	35.7	28.2	34.6	5-37
(U/l) e	5.6	4.4	4.6	4.9	5.7	4.2	5.2	
GPT x	41.5	48.4	41.5	39.6	34.5	32.4	33.2	5-40
(U/l) e	4.8	7.2	9.3	3.5	4.8	7.2	6.3	
FA x	305.5	284.9	262.5	229.7	234.3	218	215.6	98-279
(U/l) e	42.1	28.1	24.6	15.5	8	18.3	17.3	
GGT x	125.4	124.7	107.6	71.12	66.4	62.8	67.2	11-60
(U/l) e	19.3	24.7	22.5	9.7	4.5	10.4	6.7	
BT x	1.1	0.8	0.9	0.6	0.7	0.7	0.5	0.1-1
(mg %)e	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	
Ac Pr x	97.5	92.6	93.1	95.5	94.8	99	99.8	60-100
(%) e	3.2	5.1	2	2.4	3.3	0.4	0.2	

TABLA II. **Flujo biliar** (ml/día) y concentraciones medias diarias (mMol/l) de los **lípidos biliares** (Fos: fosfolípidos; Col: colesterol; A B: ácidos biliares) correspondientes al **grupo control** durante los 12 primeros días postoperatorios. (p: significación estadística del contraste de medias con el día 12° postoperatorio. Test de Mann-Whitney).

	Día 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
x	2	3.4	3.8	5.3	5.8	6.3	7.1	7.3	8	8	8.3	8.3
Fos e	0.6	0.5	0.7	0.8	0.6	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.9
p	0.0002	0.0005	0.002	0.033	0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
x	1.5	3.3	2.9	3.5	3.3	3.6	4	4.2	4.3	5.6	5.4	5.9
Col e	0.3	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6	0.6	0.5	0.8	0.7	0.7
p	0.0001	0.009	0.001	0.025	0.005	0.017	0.04	0.03	n.s.	n.s.	n.s.	-
x	9.4	8.7	9.8	15.1	17.4	21	21.7	24.5	24.4	26.8	29.6	27.8
A B e	1.3	1.3	1.5	2.1	1.9	2.1	2.2	2.4	2.2	3.1	4.1	3.9
p	0.0002	0.0002	0.0004	0.009	0.037	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
x	387.8	481	485	540.6	528	504.6	575	605	620	654.5	668.1	681.8
Flu e	43	50.1	34.8	47.5	49	32	68.9	61.4	51.7	72.4	73.6	66.1
p	0.001	0.01	0.011	n.s.	n.s.	0.014	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-

(V.N.: Fosfolípidos: 1.9-11.8; Colesterol: 2.5-8.2; Ac. Biliares: 5-40 mMol/l; Flujo : 300-800 ml)

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA III. Flujo biliar (ml/día) y concentraciones medias diarias (mMol/l) de los lípidos biliares en los dos periodos de 6 días del postoperatorio del **grupo control.**(x: media; e: error estándar; p: significación estadística del contraste de medias entre los dos periodos. Test de la "t" de Student).

		Periodo 1	Periodo 2	p
Fo	x	4.4	7.8	<0.0001
	e	0.3	0.3	
Co	x	3	4.8	<0.0001
	e	0.2	0.3	
A B	x	13.5	25.5	<0.0001
	e	0.8	1.2	
Flu	x	487.9	628.8	<0.0001
	e	18	26.2	

TABLA IV. Densidad (n° de células/extensión) y **composición celular** (porcentaje de cada tipo de células) media diaria del **grupo control**. (p: significación estadística del contraste de medias entre el día 1 y los demás. Test de Mann-Whitney). No hubo diferencias significativas en la composición celular entre los 5 primeros días (test de proporciones). Cada porcentaje medio viene expresado con su intervalo de confianza.

		Día 1	2	3	4	5
Densidad	x	53.3	30.7	23.3	11	1.7
	e	15.5	5.4	5.3	4.9	0.9
	p		n.s.	n.s.	0.02	0.0019
PMN (%) POLIMORFONUCLE		94 (86.8-100)	81.2 (70-92.5)	87.9 (78.5-97.3)	94 (83.4-100)	100
MN MONONUCLEADAS		0	0.4 (0-2.2)	1.2 (0-4.5)	1 (0-5.4)	0
Mc MACROFAGOS		0	1.7 (0-5.4)	0.4 (0-2.3)	1 (0-5.4)	0
Eo EOSINOFILOS		0	0	0	0	0
B BLASTOS		0	0	0	0	0
Ep EPITELIALES		6 (0-13.2)	16.7 (5.9-27.4)	10.5 (1.6-19.2)	4 (0-12.8)	0
F FANTASMA		0	0	0	0	0

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA V. Parámetros analíticos del **perfil hepático** correspondientes al **grupo trasplante con evolución normal**, el día previo a la intervención y durante los 18 primeros días postoperatorios . (x: media; e: error estándard).

		PREOP	Día 1	3	5	7	9	12	15	18
GOT (U/l)	x	615	532.8	209.4	136.5	50.8	43.5	35.8	36.3	30.6
	e	55.4	109.2	44.2	47.9	5.7	5.2	3.2	2.9	3.6
GPT (U/l)	x	700.3	586.2	423.3	235	148.4	83.8	65.7	52.8	46.6
	e	55.8	105.7	88	57.2	29.5	10.2	9.3	7.7	7.4
FA (U/l)	x	225.6	182.2	175.8	172.8	177.5	173.6	175	172.1	161.6
	e	22.9	21.3	16.2	12	11.6	10.8	12	11.4	11.9
GGT (U/l)	x	87.3	75.4	72.7	76.4	84.6	86.2	77.4	68	66.6
	e	6	14.8	13	10.7	7.4	8.6	7.7	4.6	4.9
BT (mg%)	x	8.3	5.5	4.8	4	3.1	2.8	2.5	2	1.3
	e	1.2	0.7	0.9	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3
Ac Pr (%)	x	27.9	56.9	72.5	78.1	80.1	79.5	83.5	85.5	89.6
	e	2.4	4.9	4.6	3.4	2.8	3.6	3.2	1.8	2.9

TABLA VI. Parámetros analíticos del **perfil hepático** correspondientes al **grupo trasplante durante las complicaciones (fallo primario del injerto, rechazo y sepsis)**. (x: valores medios obtenidos durante los episodios; e: error estándar).

		FALLO P.	RECHAZO	SEPSIS
GOT (U/l)	x	2593.4	510.4	94.2
	e	835.8	79.7	14
GPT (U/l)	x	3175.4	665.5	205.9
	e	729.8	74.1	47.1
FA (U/l)	x	233.4	261.3	240.5
	e	19.4	13.4	8.4
GGT (U/l)	x	97.6	134.7	110.5
	e	6.2	15.8	9
BT (mg %)	x	9.7	13.7	7
	e	1.1	1.7	1.1
BD (mg %)	x	6	11.4	4.9
	e	0.7	1.3	1
Ac Pr (%)	x	19.3	52	66.2
	e	1.8	3	3.9

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA VII. Flujo biliar medio (ml/día) y **concentraciones medias diarias de los lípidos biliares** (mMol/l) de los pacientes trasplantados con evolución normal durante los primeros 18 días del postoperatorio. (p: nivel de significación estadística en el contraste de medias entre el día 18 y los demás).

		Día 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fo	x	1.8	2.5	3.9	4.5	3.6	4	3.8	4.3	4.3	4.8	5.5	4.6	4.8	5.3	5.8	5.5	6	6.7
	e	0.3	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6	0.4	0.5	0.5	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5
	p	0.0001	0.0003	0.0042	0.0188	0.0014	0.0051	0.002	0.0085	0.0042	0.017	n.s.	0.038	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
Co	x	1.4	1.9	2.3	2.8	2.4	2.6	2.4	2.6	3	3.2	3.2	3	2.7	3.3	3.3	3.1	3.1	4.3
	e	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.6	0.5	0.6	0.8	0.7	1	1	0.7	0.5	1.2
	p	0.0001	0.0035	0.047	0.021	0.003	0.018	0.006	0.0085	0.025	n.s.	n.s.	n.s.	0.008	n.s.	0.033	n.s.	n.s.	-
AB	x	3.7	9.4	14.3	16.3	15.5	15.9	16.6	16.7	18.2	17.3	16.4	16.2	16.8	16	16.5	18.3	18.1	20
	e	0.6	1.5	2	1.9	1.8	2.3	2.3	2.3	2.5	2.4	3	3.1	3.8	3.1	3.1	3.8	3.2	3.3
	p	0.0001	0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
Flu	x	140.5	149.9	197.5	241.5	296.9	334.1	381.4	353.6	382.6	397	426	413.2	441	456.9	492.3	491	507.5	516.2
	e	20.8	21.7	23.9	34	48.5	38.2	39.1	27.3	39	47	38.5	45.8	43.3	41.5	61	44.8	42.6	36.7
	p	0.0001	0.0001	0.0001	0.0003	0.0019	0.002	0.026	0.004	0.009	0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-

(Fo: fosfolípidos; Co: colesterol; AB: ácidos biliares; Flu: flujo biliar o volumen biliar/24h.)

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA VIII. Flujo biliar medio diario (Flu) (ml/día) **y concentraciones medias diarias de fosfolípidos (Fos), colesterol (Col) y ácidos biliares (AB)** (mMol/l) en cada uno de los 3 periodos de 6 días del postoperatorio de los **pacientes trasplantados con evolución normal.** (x: media; e: error estándar; p: nivel de significación estadística del contraste de medias entre los periodos. Test de la "t" de Student).

		Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	p
Fos	x	3.4	4.5	5.7	P1 vs P2 : 0.003
	e	0.3	0.2	0.3	P2 vs P3 : 0.0007
Col	x	2.2	2.9	3.3	P1 vs P2 : 0.016
	e	0.2	0.2	0.3	P2 vs P3 : n.s.
A B	x	12.6	17	17.6	P1 vs P2 : 0.0011
	e	0.8	1	1.3	P2 vs P3 : n.s.
Flu	x	226.8	388.4	484.1	P1 vs P2 : 0.0001
	e	15	16	18.2	P2 vs P3 : 0.0001

TABLA IX. Flujo biliar medio diario (ml/día) **y concentraciones medias diarias de los lípidos biliares** (mMol/l) de los pacientes **trasplantados** durante los episodios de **sepsis, rechazo** (Rech. 2: valores medios durante los episodios de rechazo aparecidos en la segunda semana del postoperatorio; Rech. 3: valores medios durante los episodios de rechazo en la 3ª semana postoperatoria) **y fallo primario del injerto.**(x: media; e: error estándar).

		Fallo p.	Rech. 2	Rech. 3	Sepsis
Fos	x	0.2	2.2	0.8	1.5
	e	0.02	0.5	0.2	0.1
Col	x	0.2	1.6	0.8	1.1
	e	0.1	0.4	0.1	0.1
A B	x	0.4	8.9	3.1	6.7
	e	0.1	2.2	0.6	1
Flu	x	91.2	169.4	176.4	315.9
	e	38	27.8	32.4	27.6

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA X. Nivel de significación estadística (p) en el contraste de medias **(flujo biliar medio y concentraciones medias diarias de los tres lípidos biliares: Fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares)** entre los pacientes trasplantados durante las complicaciones y los que evolucionaron con normalidad durante los mismos periodos del postoperatorio. Test de Mann-Whitney.

	Fallo vs P1	Re2 vs P2	Re3 vs P3	Sep vs P2	Sep vs Re2
Fos	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.
Col	<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	n.s.
A B	<0.0001	0.0026	<0.0001	<0.0001	n.s.
Flu	0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.	0.0021

P1: 1er periodo de 6 días del postoperatorio de los pacientes traspl. sin complicaciones.
P2: 2° periodo de 6 días del postoperatorio de los pacientes traspl. sin complicaciones.
P3: 3er periodo del postoperatorio de los pacientes traspl. sin complicaciones.
Fallo: Valores medios de los pacientes durante el fallo primario del injerto.
Re2: Valores medios durante los episodiosde rechazo del 2° periodo.
Re3: Valores medios durante los episodios de rechazo del 3° periodo.
Sep: Valores medios durante los episodios de sepsis (2° periodo).

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA XI. Densidad celular (n° de células por extensión) y **composición celular media diaria** (porcentaje medio de los distintos tipos celulares) de los pacientes **trasplantados con buena evolución**, en cada uno de los 5 primeros días postoperatorios. (x: media, e: error estándar; i: intervalo de confianza. p: nivel de significación estadística en el contraste de medias entre el día 1 y los demás, mediante el test de Mann-Whitney). Respecto a la composición celular no se observaron diferencias significativas entre los primeros días del postoperatorio (Test de proporciones). Global 1-5: Densidad y composición celular media de los 5 primeros días.

	Dia 1	2	3	4	5	Global 1-5
Densidad x	115.6	60.3	23.7	6.9	2.5	51.6
e	31.4	17.8	7	3.7	1	10.4
p	-	n.s.	0.0009	<0.0001	<0.0001	-
PMN (%) x	80.3	73.9	48.3	62.1	64	69.1
POLIMORFO. i	(70-90.5)	(62.2-85.7)	(31.7-65)	(43.8-80.5)	(42.5-85.5)	(62.2-76)
MN MONONUCLEAD	0	0	1.1 (0-4.6)	0	0	0.2 (0-0.9)
Mc MACROFAGOS	1.7 (0-5)	2.9 (0-7.3)	0.5 (0-3)	0.7 (0-3.9)	1 (0-4.4)	1.7 (0-3.6)
Eo EOSINOFILOS	1.3 (0-4.3)	1.5 (0-4.6)	0	0	0	0.9 (0-2.1)
B BLASTOS	0	0	0	0	0	0
Ep EPITELIALES	13.1 (4.4-21.8)	18.9 (8.5-29.4)	37.8 (21.6-53.9)	29.3 (12.1-46.5)	22 (3.5-40.5)	22.4 (16.1-28.6)
F FANTASMA	3.6 (0-8.5)	2.8 (0-7.3)	12.2 (1.3-23.1)	7.9 (0-18)	13 (0-28)	5.7 (2.2-9.2)

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA XII. Parámetros citológicos (densidad y composición celular) de los pacientes trasplantados durante las complicaciones (**fallo primario del injerto, rechazo y sepsis**). (x: media; e: error estándar; i: intervalo de confianza de los pordentajes).

		FALLO P.	RECHAZO	SEPSIS
Densidad	x	98.3	273.4	85.9
	e	12.4	59.9	5.5
PMN (%)	x	59.2	84.2	96.5
POLIMORFO.	i	(45-73.4)	(77.5-90.8)	(92-100)
MN MONONUCLEAD		2.5 (0-7)	6.9 (2.3-11.5)	2.5 (0-6.2)
Mc MACROFAGOS		5.8 (0-12.6)	6.8 (2.2-11.4)	1 (0-3.5)
Eo EOSINOFILOS		0	0	0
B BLASTOS		0	0.2 (0-1)	0
Ep EPITELIALES		29.2 (16-42.3)	1.3 (0-3.4)	0
F FANTASMA		3.3 (0-8.5)	0.6 (0-2.2)	0

TABLA XIII. Nivel de significación estadística en el contraste de la **densidad celular media** de las extensiones celulares obtenidas durante las diversas **complicaciones** del grupo de pacientes trasplantados y las obtenidas durante los 5 primeros días del postoperatorio en los pacientes trasplantados con **evolución normal**. Test de Mann-Whitney.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	SEPSIS	RECH.
FALLO P.	n.s.	0.0093	0.0001	0.0001	0.0001	n.s.	n.s.
RECHAZO	0.028	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.01	
SEPSIS	n.s.	0.005	0.0001	0.0001	0.0001		

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA XIV. Nivel de significación estadística en el contraste de porcentajes medios (**composición celular**) obtenidos en los pacientes trasplantados durante las **complicaciones** y el global obtenido durante los 5 primeros días en los pacientes trasplantados con **evolución normal**. Test de proporciones.

	N vs Fallo	N vs Re	N vs Sp	Re vs Sp	Re vs Fallo	Sp vs Fallo
PMN (%)	n.s.	n.s.(0.06)	0.01	n.s.	0.04	0.005
MN	n.s.	0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Mc	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Eo	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
B	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ep	n.s.	0.005	0.01	n.s.	0.002	0.008
F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

(N: Evolución normal; Fallo: Fallo primario; Re: Rechazo; Sp: Sepsis.)
(PMN: Polimorfonucleares; MN: Mononucleadas; Mc: Macrófagos; Eo: Eosinófilos; B: Blastos; Ep: Cel. epiteliales; F: Cel. fantasma).

TABLA XV. Comparación de la **densidad celular media diaria** entre los grupos **control** y **trasplante con evolución normal.** (x: media; e: error estándar; p: nivel de significación estadística). Test de Mann-Whitney.

	Día 1	2	3	4	5
Control x	53.3	30.7	23.3	11	1.7
e	15.5	5.4	5.3	4.9	0.9
Trasplante x	115.6	60.3	23.7	6.9	2.5
e	31.5	17.8	7	3.7	1
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA XVI. Comparación de la **composición celular media global** (5 primeros días del postoperatorio) de los grupos **control** y **trasplante con evolución normal**. (x: porcentaje medio; i: intervalo de confianza; p: nivel de significación estadística). Test de proporciones.

	CONTROL	TRASPLANTE	p
PMN (%) x POLIMORFO. i	88.4 (83.3-93.4)	69.1 (62.2-76)	0.01
MN MONONUCLEAD	0.6 (0-1.9)	0.2 (0-0.9)	n.s.
Mc MACROFAGOS	0.7 (0-2.1)	1.7 (0-3.6)	n.s.
Eo EOSINOFILOS	0	0.9 (0-2.1)	n.s.
B BLASTOS	0	0	n.s.
Ep EPITELIALES	10.3 (5.5-15.1)	22.4 (16.1-28.6)	0.05
F FANTASMA	0	5.7 (2.2-9.2)	0.05

TABLA XVII. Comparación del **flujo biliar medio diario y las concentraciones medias diarias de los lípidos biliares (fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares)** entre los grupos **control y trasplante con evolución normal** durante los 12 primeros días del postoperatorio. Test de Mann-Whitney.

	Día 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fos	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.01	0.002	0.05	0.01	0.05	0.05	0.05	0.05
Col	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.01	0.01	0.01	0.002	0.05	0.05	0.05	0.05
A.B.	0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.05	0.005	0.01	0.01	0.02	0.05
Flu	0.001	0.005	0.005	0.05	0.003	0.01	0.002	0.01	0.01	0.01	0.04	0.05

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TABLA XVIII. Flujo biliar y concentraciones de los lípidos biliares diarias en el periodo 3° del postoperatorio del grupo de pacientes **trasplantados con evolución normal**. Se ha realizado el contraste de medias diarias con los valores medios obtenidos en el día **12 del postoperatorio del grupo control**. Test de Mann-Whitney (x: media; e: error estándar; p: nivel de significación estadística).

		CONTROL	GRUPO TRASPLANTE					
		Día 12	Día 13	14	15	16	17	18
Fos	x	8.3	4.8	5.3	5.8	5.5	6	6.7
	e	0.9	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5
	p		0.005	0.004	0.02	n.s.	n.s.	n.s.
Col	x	5.9	2.7	3.3	3.3	3.1	3.1	4.3
	e	0.7	0.7	1	1	0.7	0.5	1.2
	p		0.003	0.02	0.01	0.03	n.s.	n.s.
AB	x	27.8	16.8	16	16.5	18.3	18.1	20
	e	3.9	3.8	3.1	3.1	3.8	3.2	3.3
	p		n.s.	0.04	0.05	n.s.	n.s.	n.s.
Flu	x	681.8	441	456.9	492.3	491	507.5	516.2
	e	66.1	43.3	41.5	61	44.8	42.6	36.7
	p		0.008	0.008	0.02	0.05	n.s.	n.s.

TABLA XIX. Comparación del **flujo y concentraciones de los lípidos biliares (fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares)** medias diarias, en los periodos de 6 días del postoperatorio, entre los grupos **control y trasplante con evolución normal**. El periodo 3 del grupo trasplante se comparó con el periodo 2 del grupo control. Test "t" de Student.

	PERIODO 1			PERIODO 2			PER. 2	PER. 3	
	CONTROL	TRASPLAN	P	CONTROL	TRASPLAN	P	CONTROL	TRASPLAN	P
Fo x	4.4	3.4	0.05	7.8	4.5	0.0001	7.8	5.7	0.0001
e	0.3	0.3		0.3	0.2		0.3	0.3	
Co x	3	2.2	0.005	4.8	2.9	0.005	4.8	3.3	0.0005
e	0.2	0.2		0.3	0.2		0.3	0.3	
AB x	13.5	12.6	n.s.	25.5	17	0.0001	25.5	17.6	0.0001
e	0.8	0.8		1.2	1		1.2	1.3	
Flu x	487.9	226.8	0.0001	628.8	388.4	0.0001	628.8	484.1	0.0001
e	18	15		26.2	16		26.2	18.2	

UNIVERSIDAD DE MURCIA

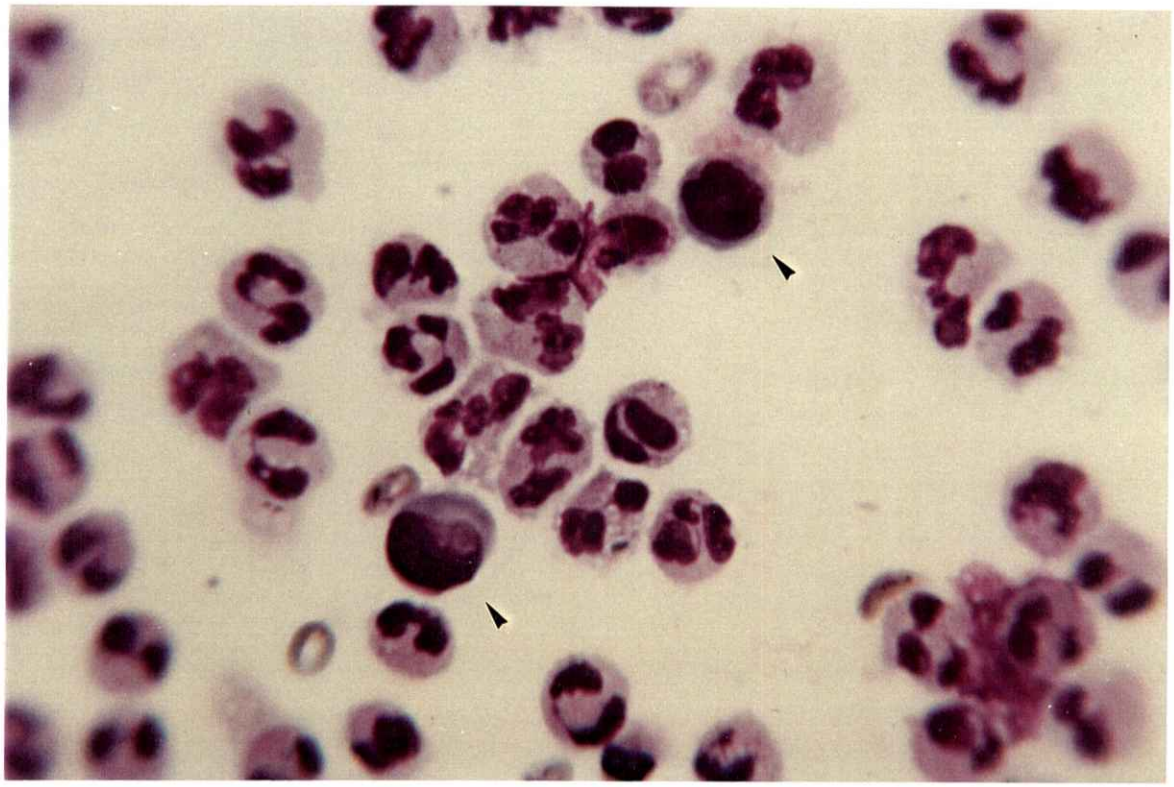


Figura 1. Abundantes leucocitos polimorfonucleares neutrófilos; nótese la presencia de dos linfocitos inmaduros o linfoblastos (►). (Diff Quick; x 1000).

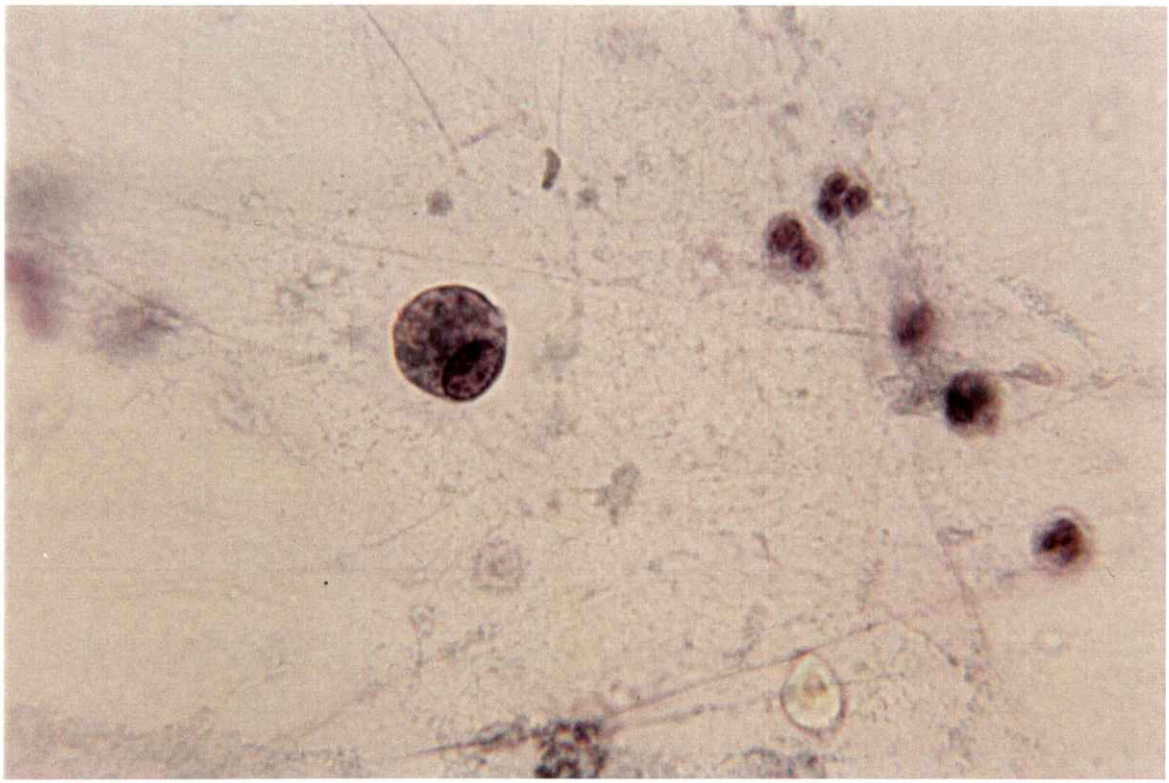


Figura 2. Celularidad escasa, constituida por varios leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, y la presencia de un macrófago. (Papanicolaou; x 1000).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

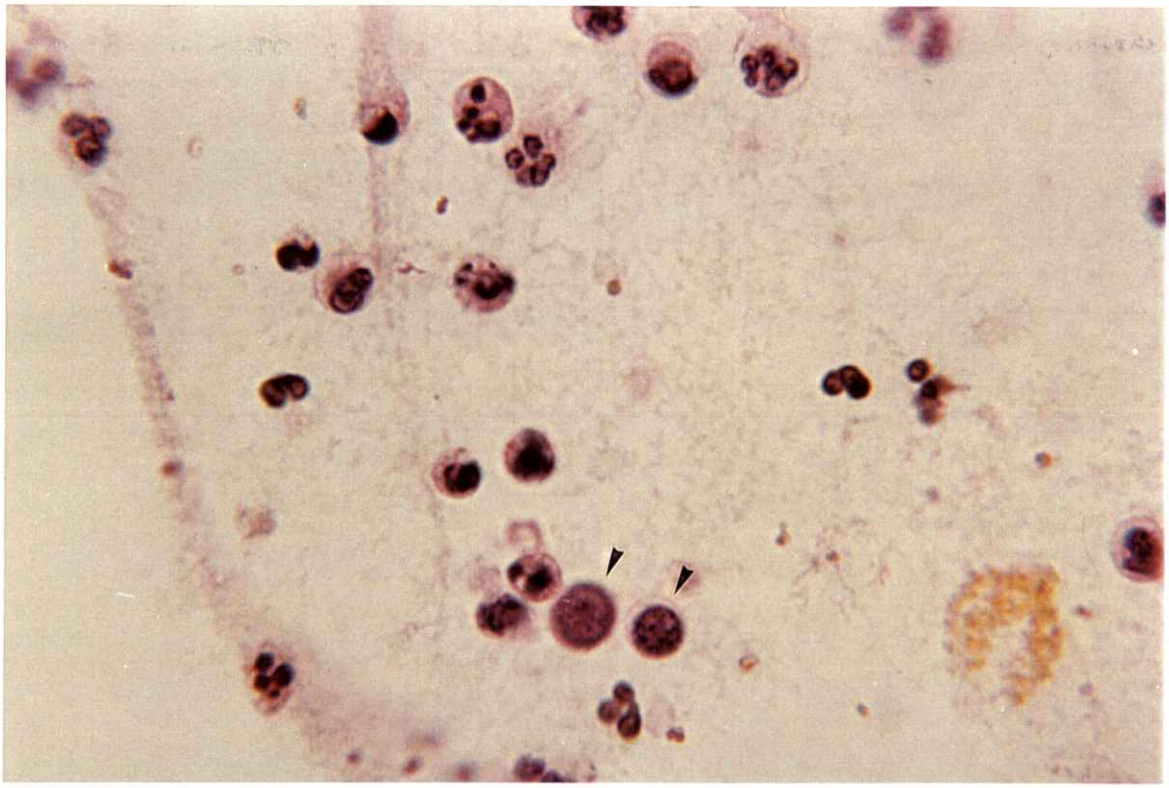


Figura 3. Celularidad moderada a expensas de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y presencia de dos linfoblastos (►). (H-E; x 1000).

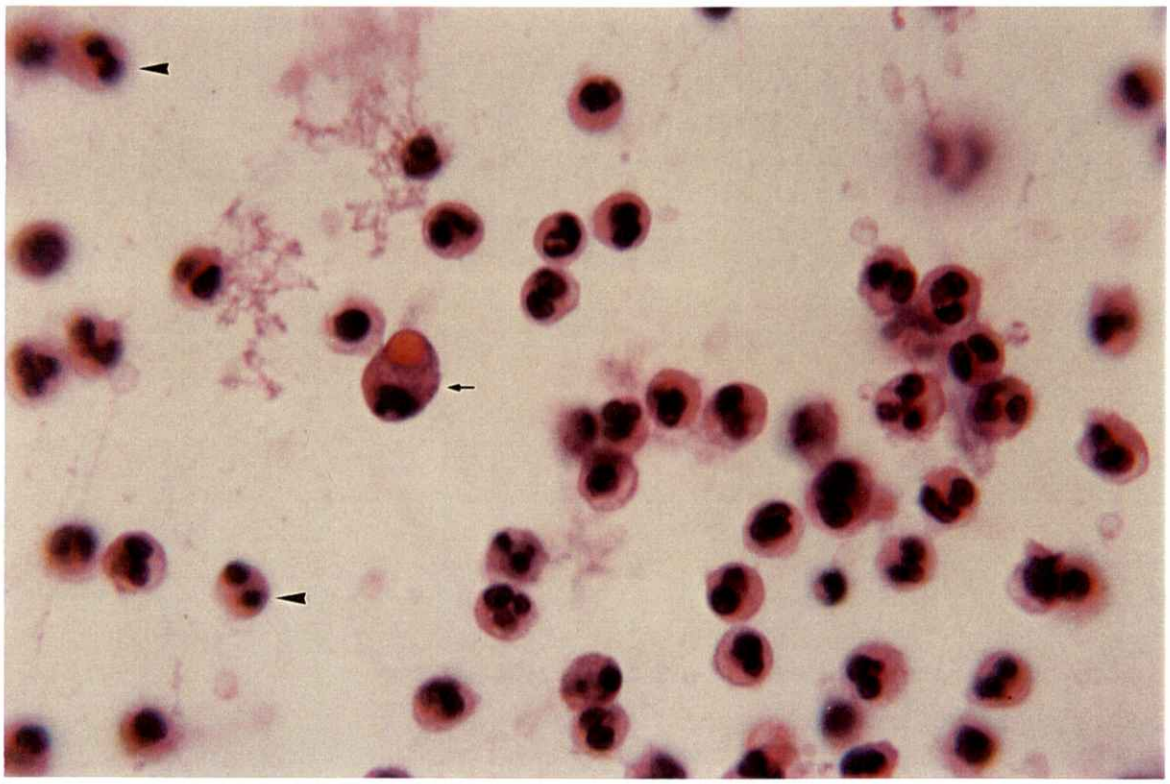


Figura 4. Celularidad abundante, con la presencia de polimorfonucleares neutrófilos, algunos eosinófilos (►) y un macrófago con inclusión eosinófila (→). (H-E; x 1000).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

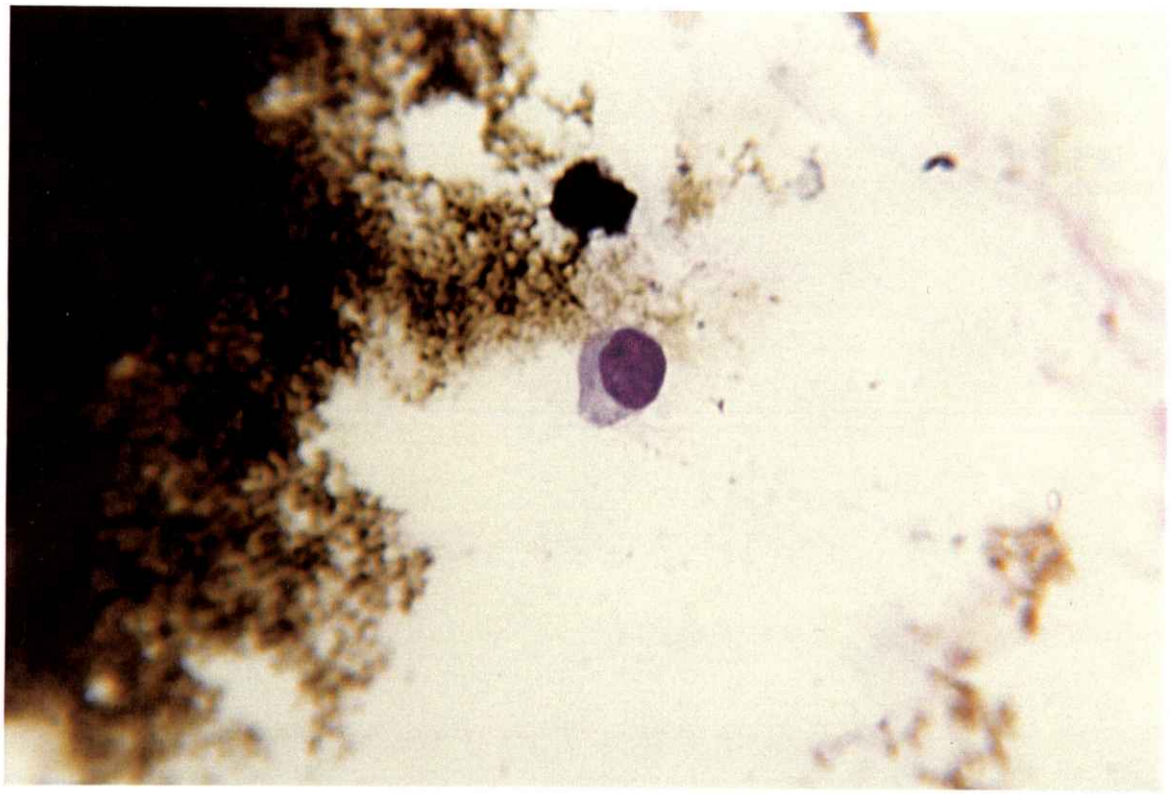


Figura 5. En el seno del material biliar, se observa una célula plasmática madura. (Diff Quick; x 1000).

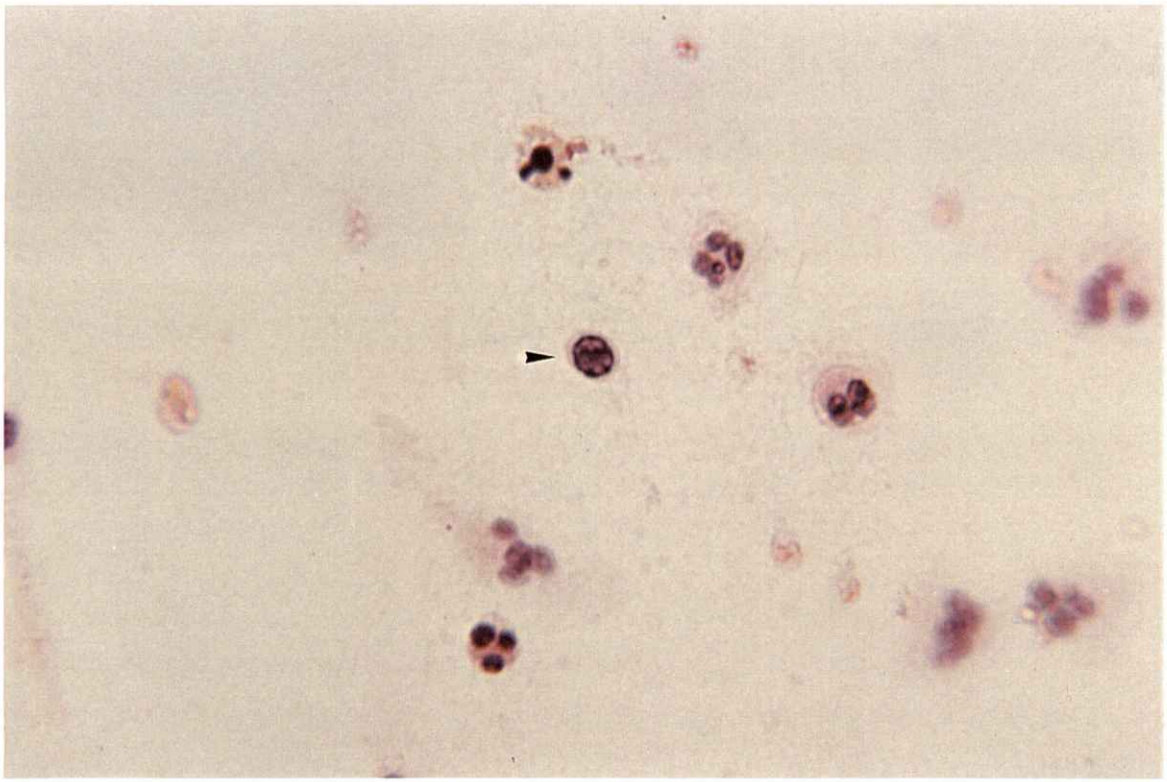


Figura 6. Celularidad escasa, con la presencia de un linfocito maduro (►). (H-E; x 400).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

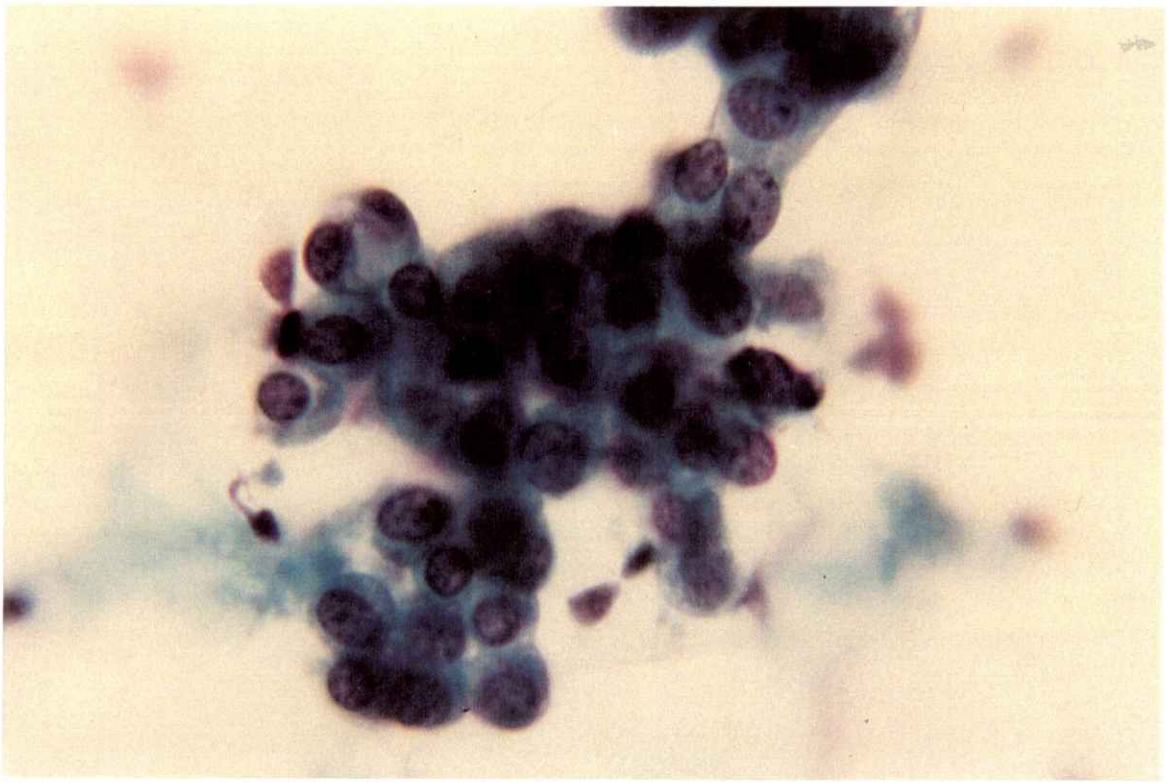


Figura 7. Acúmulo de células epiteliales ductales, dispuestas en nido sincitial. (Papanicolaou; x 1000).

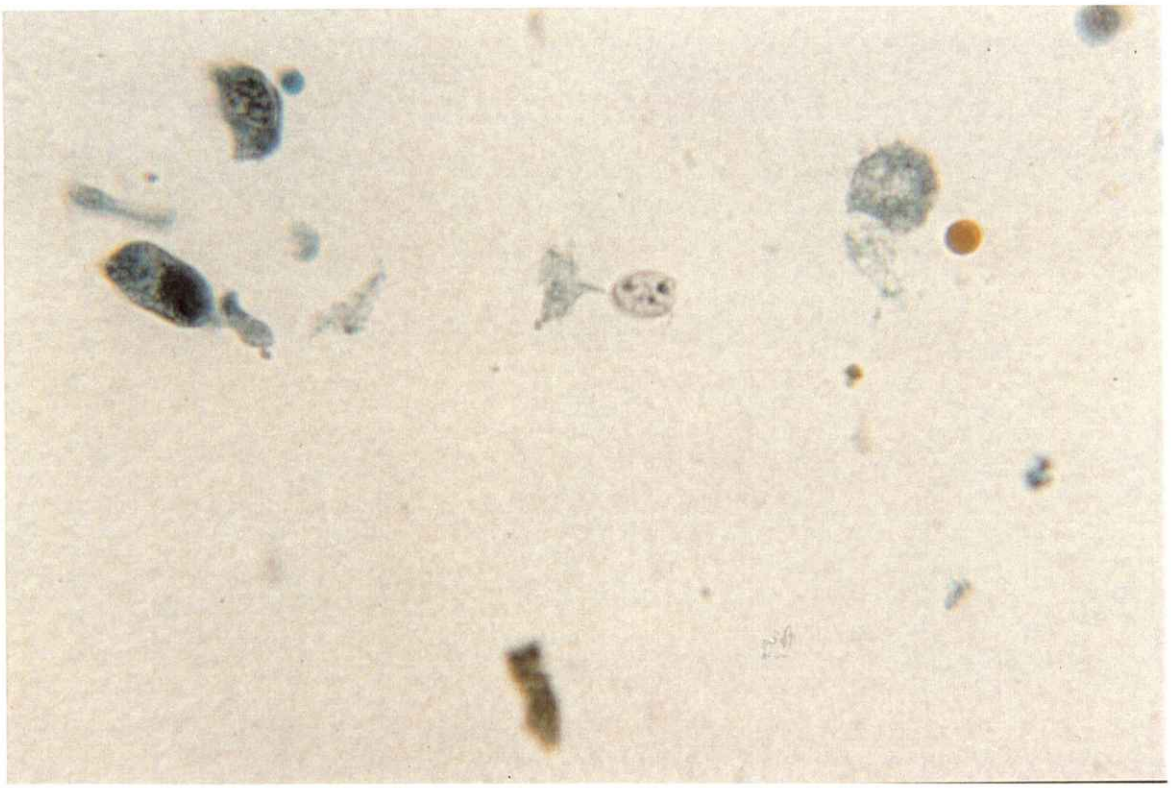
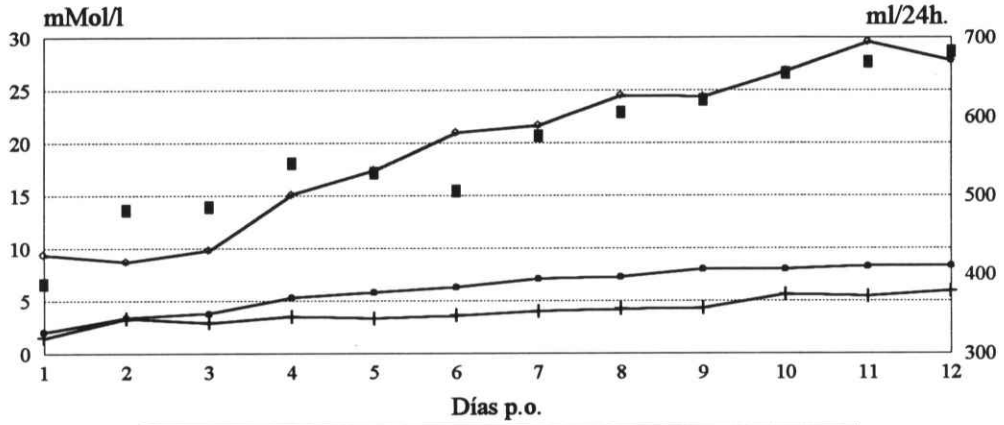


Figura 8. Celularidad escasa, constituida exclusivamente por células epiteliales con fenómenos necrobióticos (células "Fantasma"). (Papanicolaou; x 400).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

FLUJO Y LIPIDOS BILIARES (COLESTEROL, FOSFOLIPIDOS Y ACIDOS BILIARES)

GRUPO CONTROL



Días: 1-5: p<0.05 1-8: p<0.05 1-5: p<0.05 1-3, 6: p<0.05

Figura 9

FLUJO Y LIPIDOS BILIARES

PERIODOS DE 6 DIAS

GRUPO CONTROL

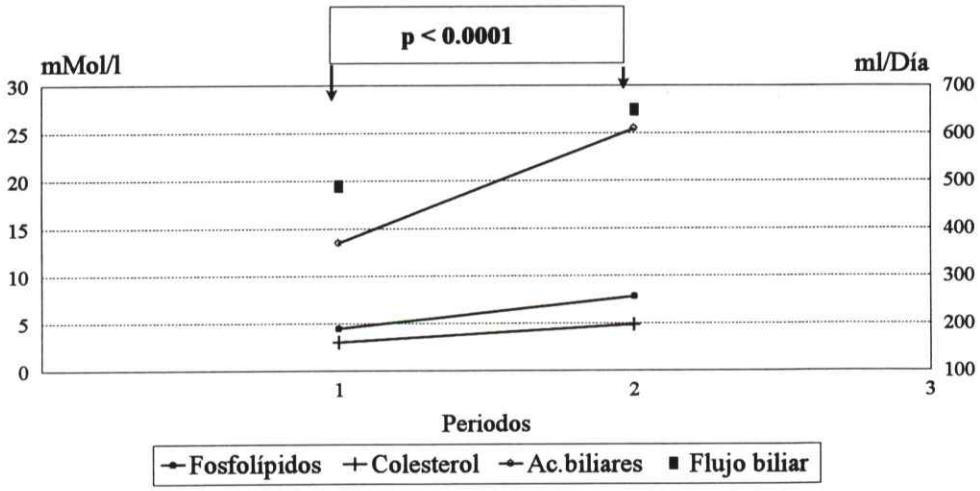


Figura 10

UNIVERSIDAD DE MURCIA

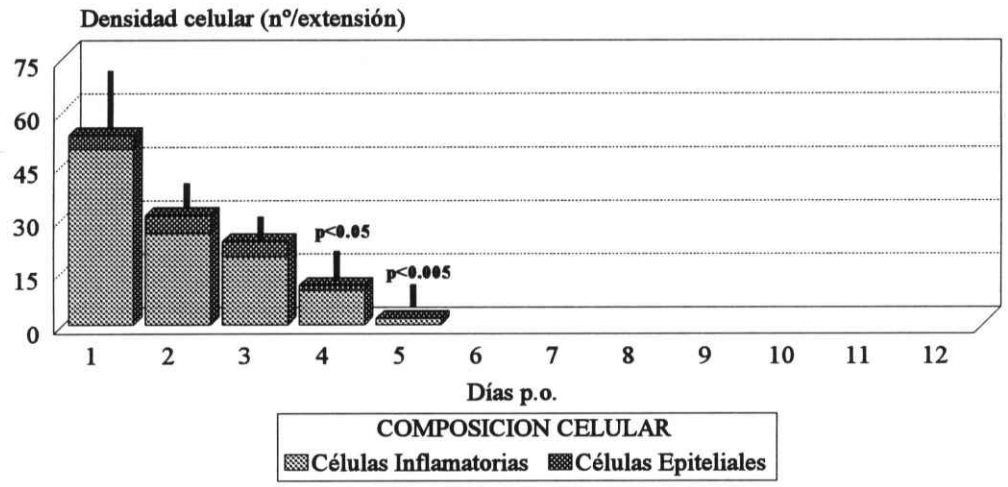


Figura 11

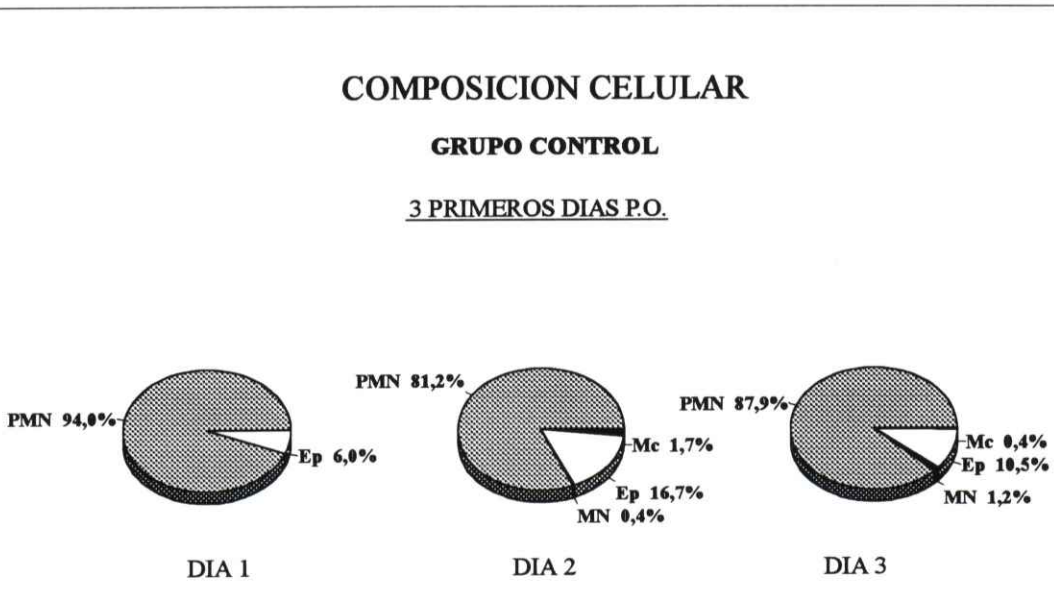


Figura 12

UNIVERSIDAD DE MURCIA

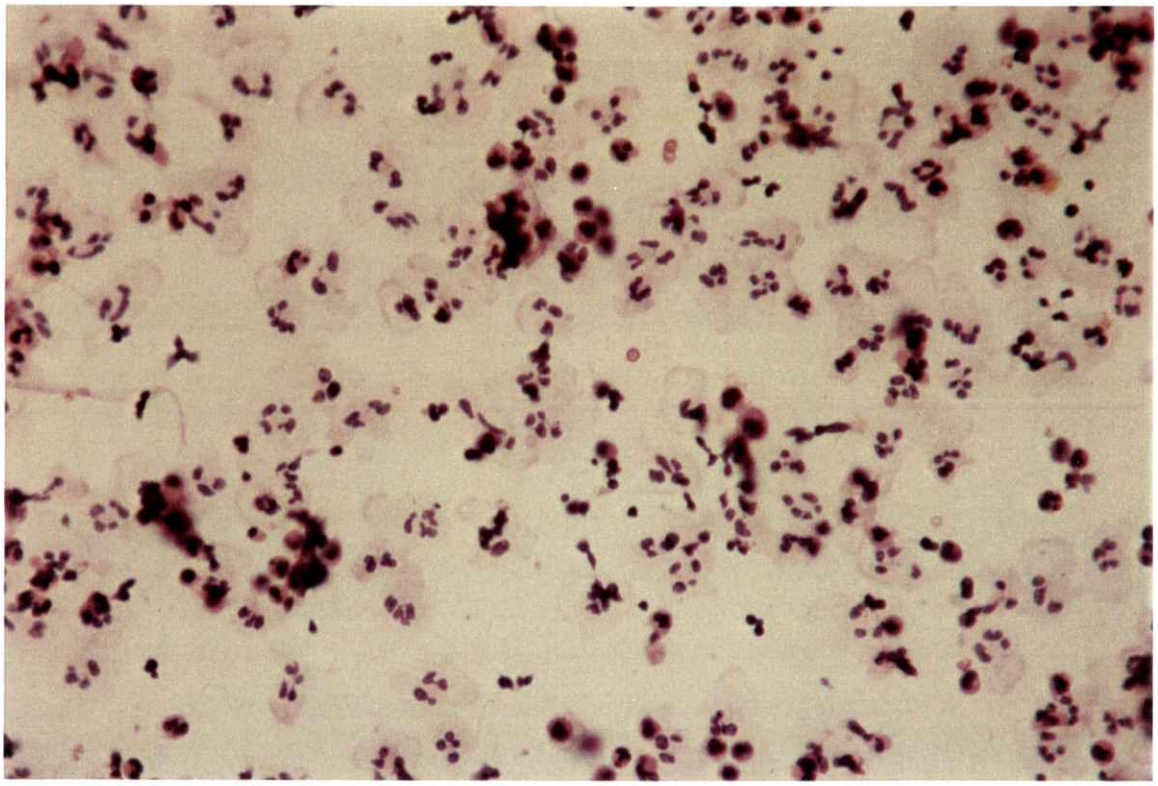


Figura 13. Celularidad alta. (H-E; x 250).

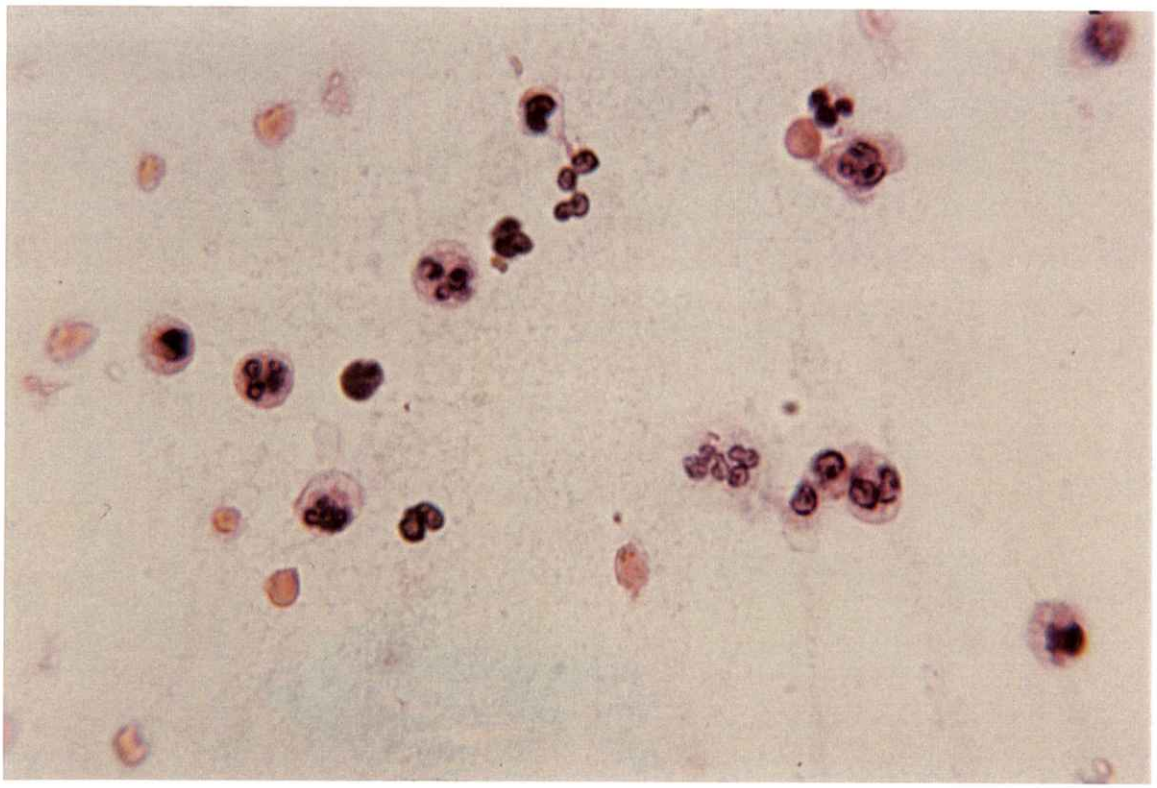


Figura 14. Celularidad baja. (H-E; x 100).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

FLUJO Y LIPIDOS BILIARES (COLESTEROL, FOSFOLIPIDOS Y ACIDOS BILIARES)

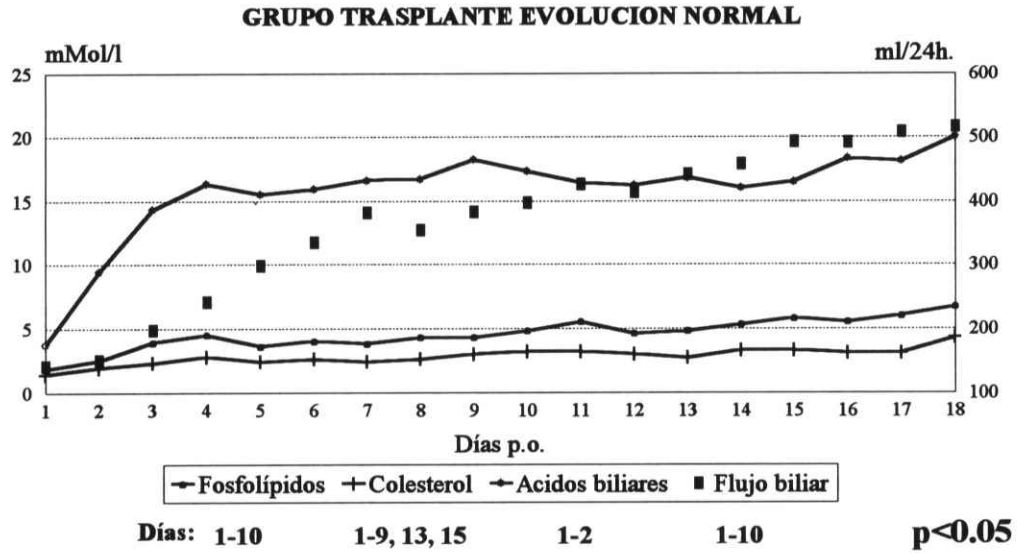


Figura 15

FLUJO Y LIPIDOS BILIARES

PERIODOS DE 6 DIAS

GRUPO TRASPLANTE EVOLUCION NORMAL

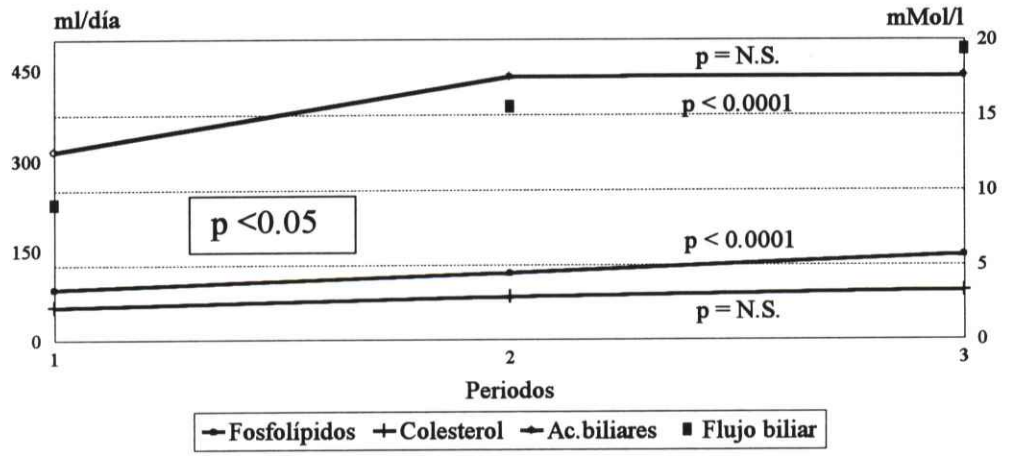


Figura 16

UNIVERSIDAD DE MURCIA

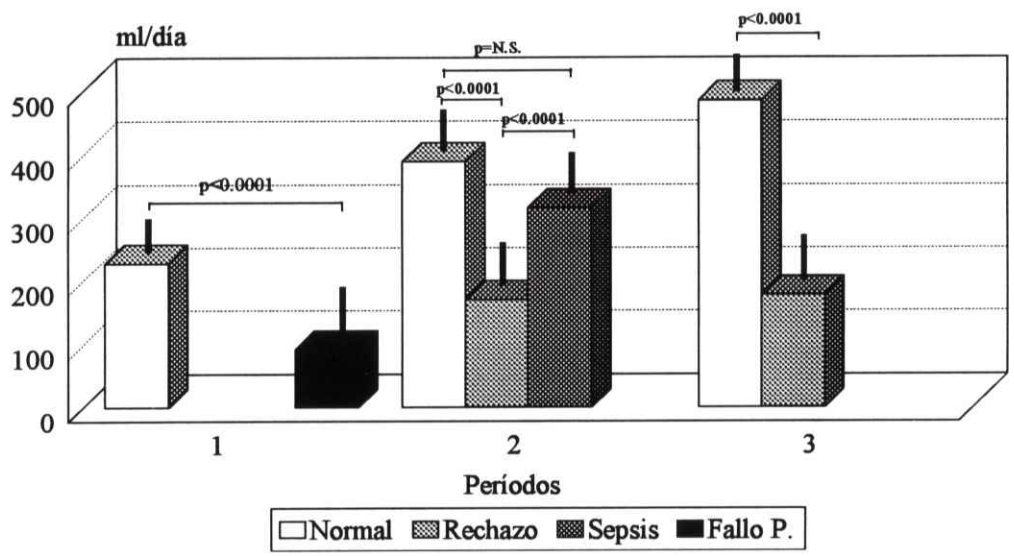


Figura 17

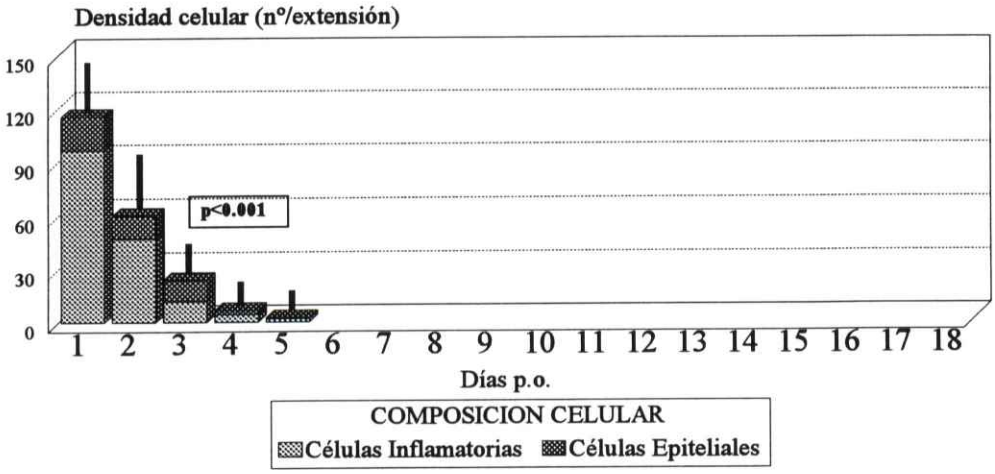


Figura 18

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DENSIDAD Y COMPOSICION CELULAR

GRUPO TRASPLANTE. EVOLUCION RECHAZO (PERIODOS 2° Y 3°)

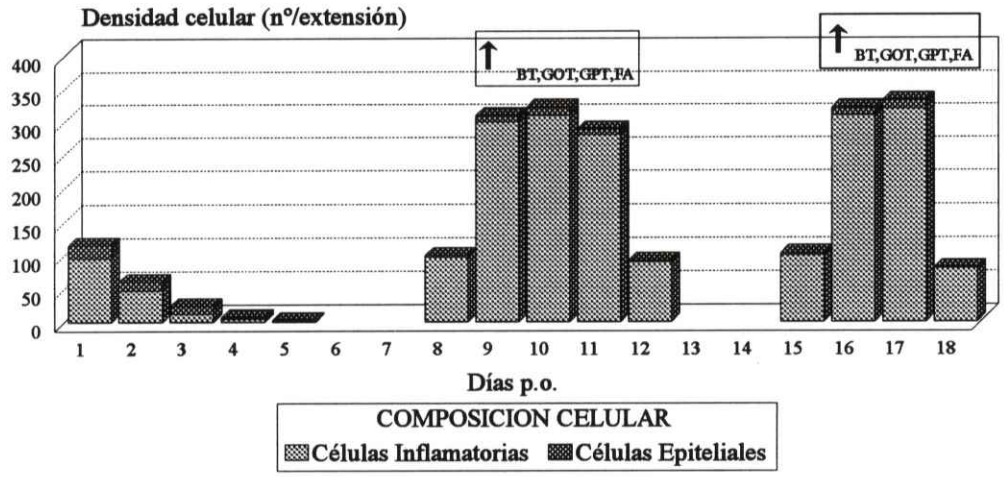


Figura 19

DENSIDAD Y COMPOSICION CELULAR

GRUPO TRASPLANTE. EVOLUCION NORMAL (DIA 1°) vs SEPSIS, RECHAZO, FALLO P.

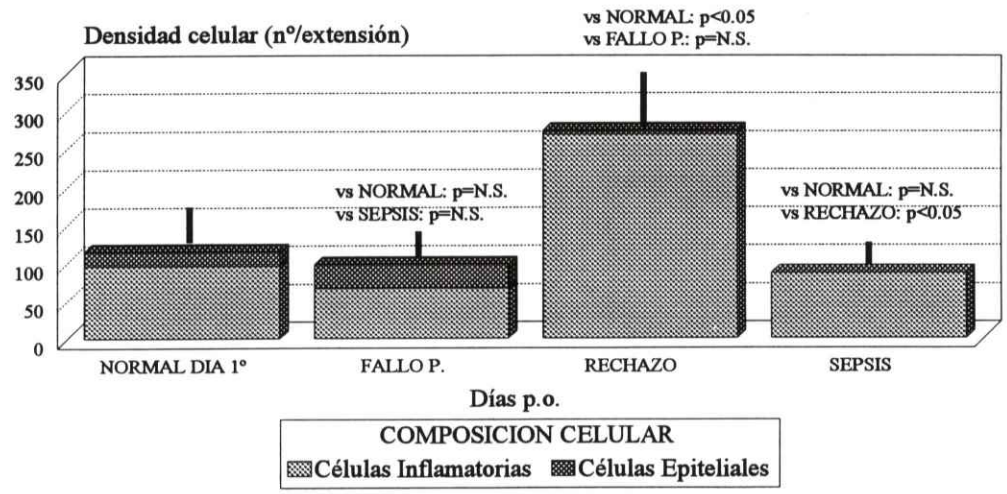


Figura 20

UNIVERSIDAD DE MURCIA

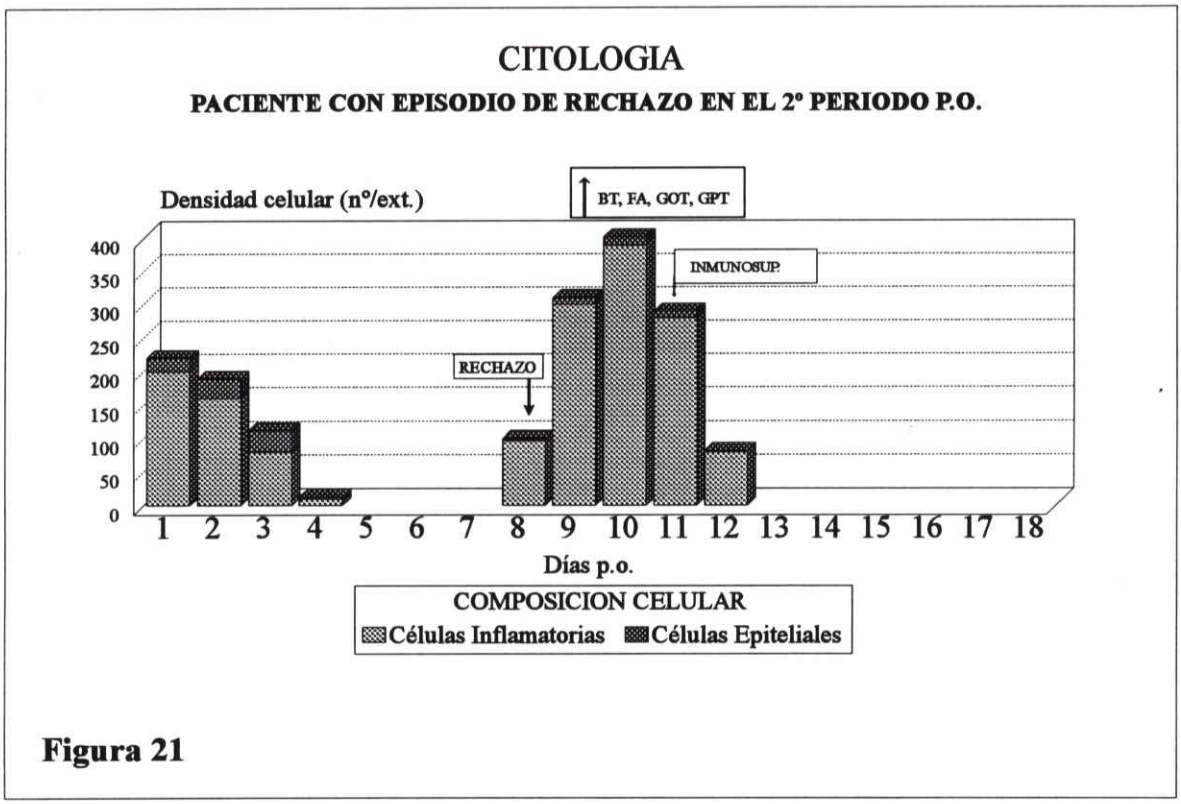


Figura 21

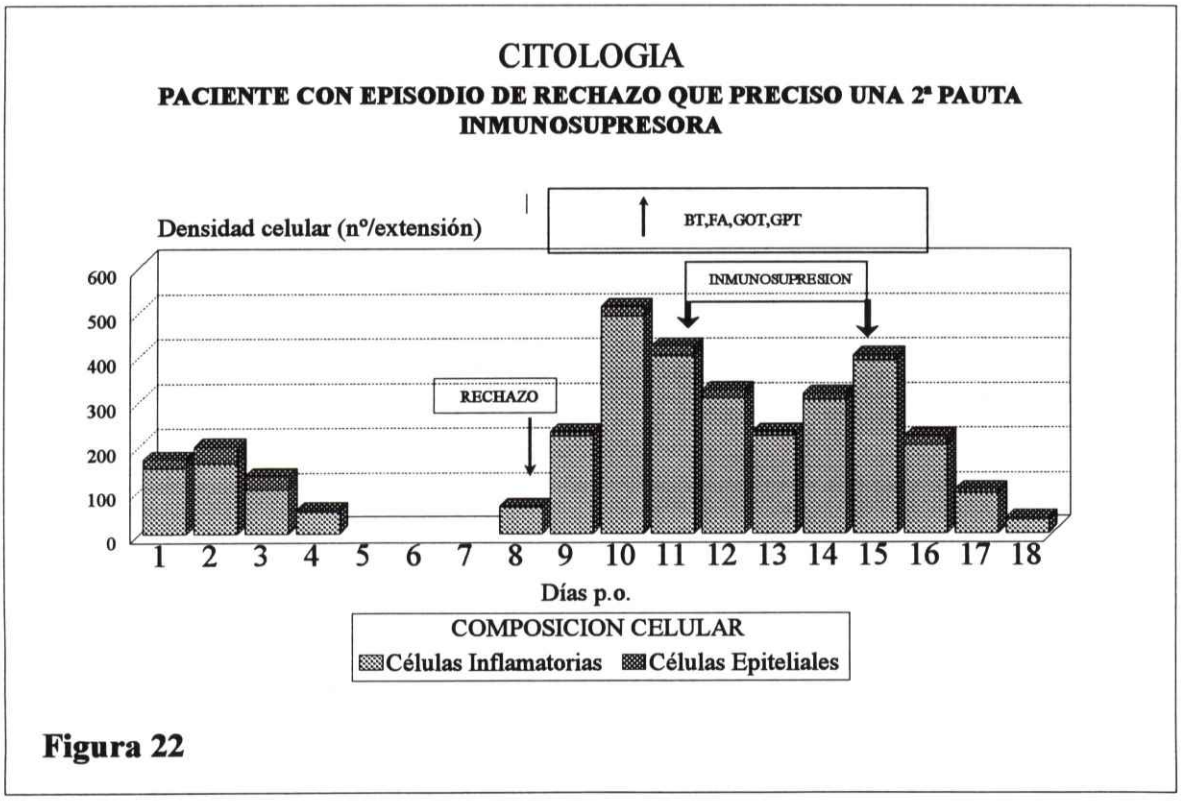


Figura 22

UNIVERSIDAD DE MURCIA

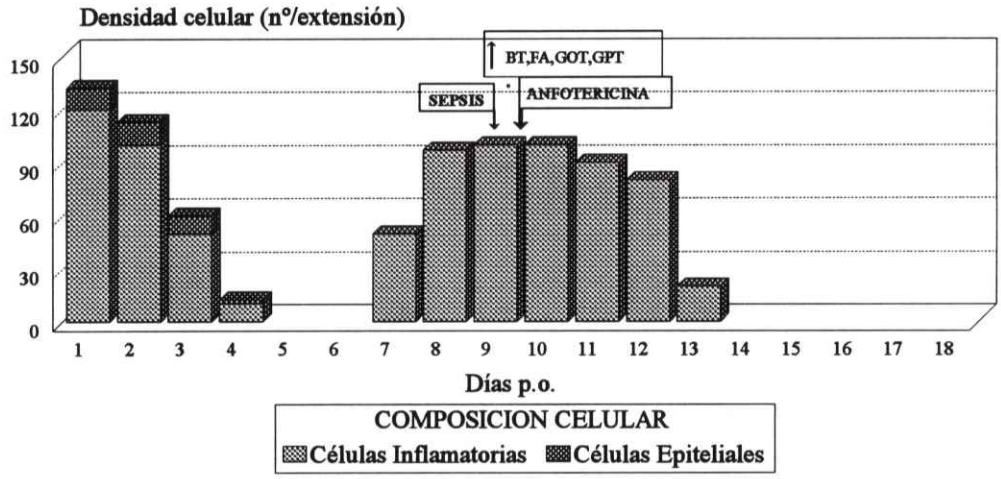


Figura 23

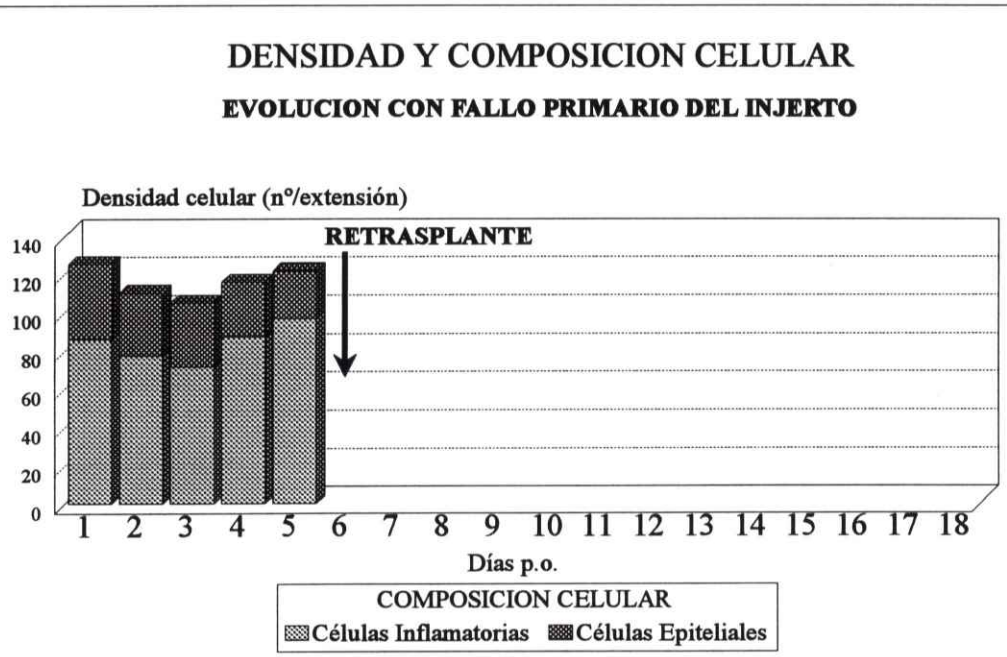


Figura 24

UNIVERSIDAD DE MURCIA

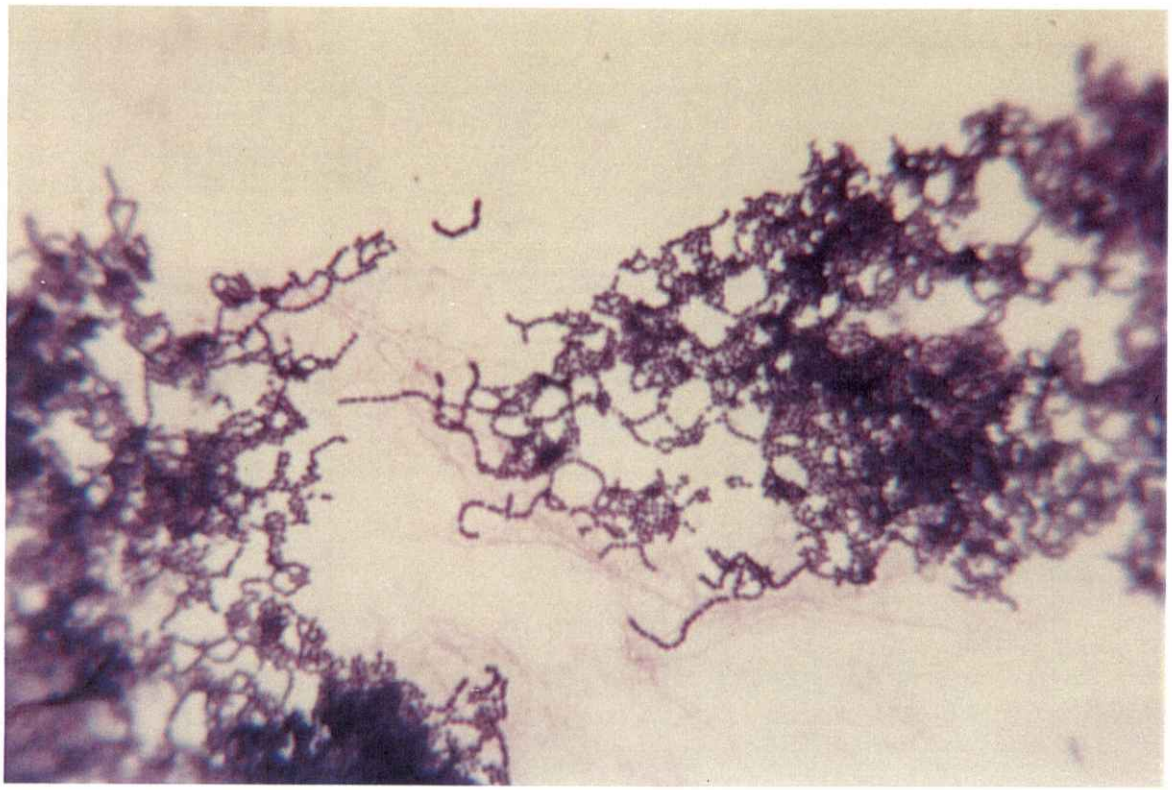


Figura 25. Abundantes gérmenes. (Diff Quick x 100).

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

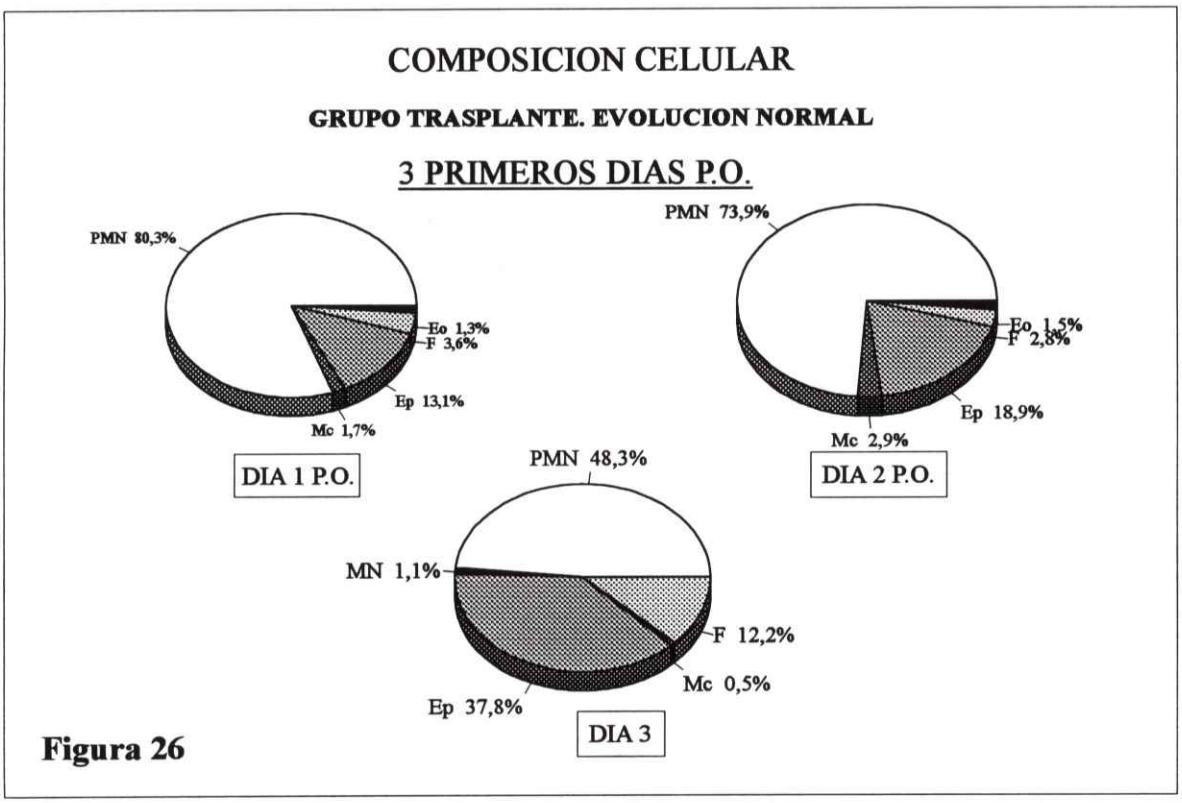


Figura 26

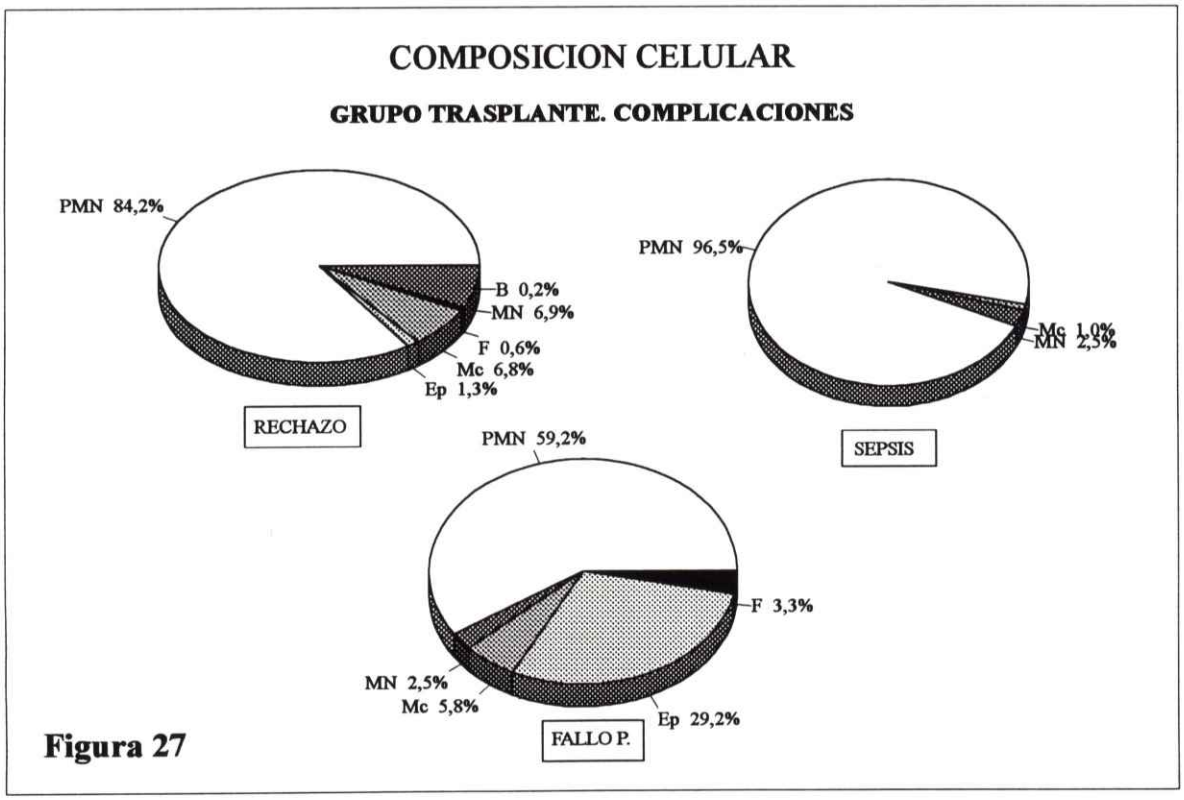


Figura 27

UNIVERSIDAD DE MURCIA

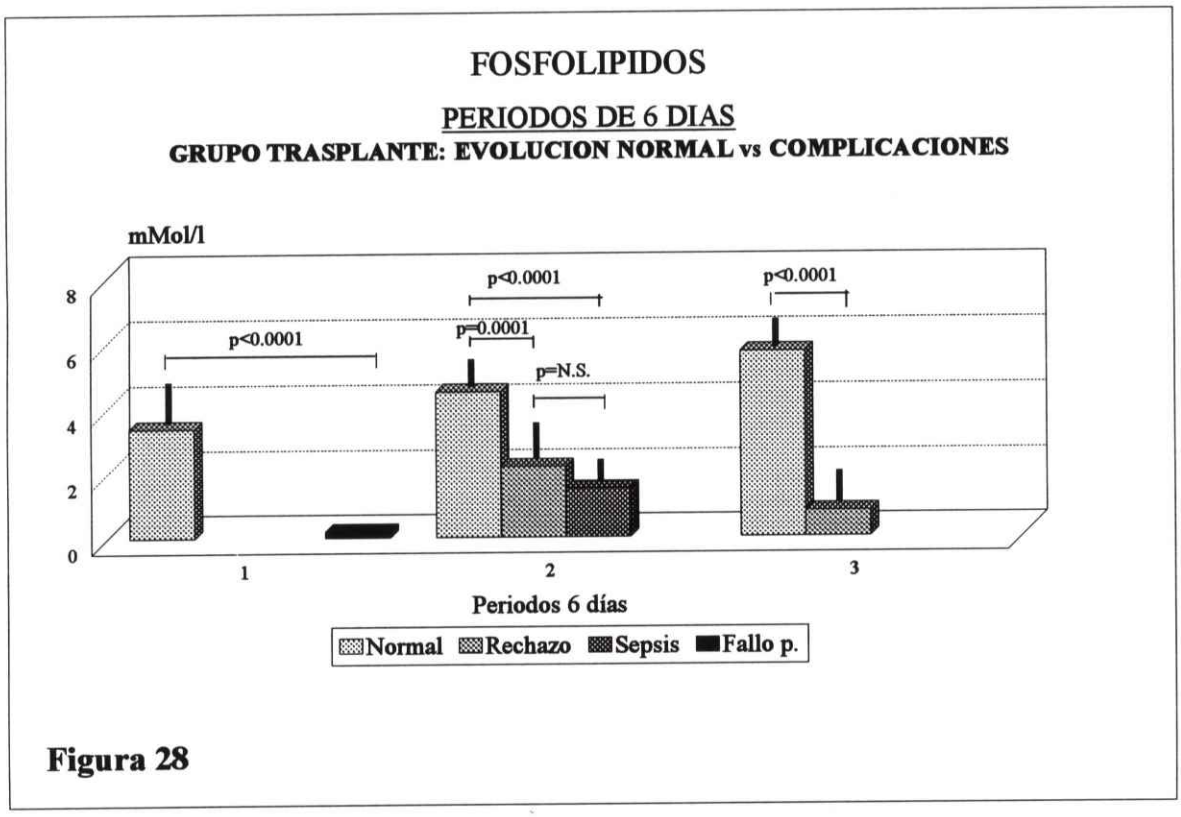


Figura 28

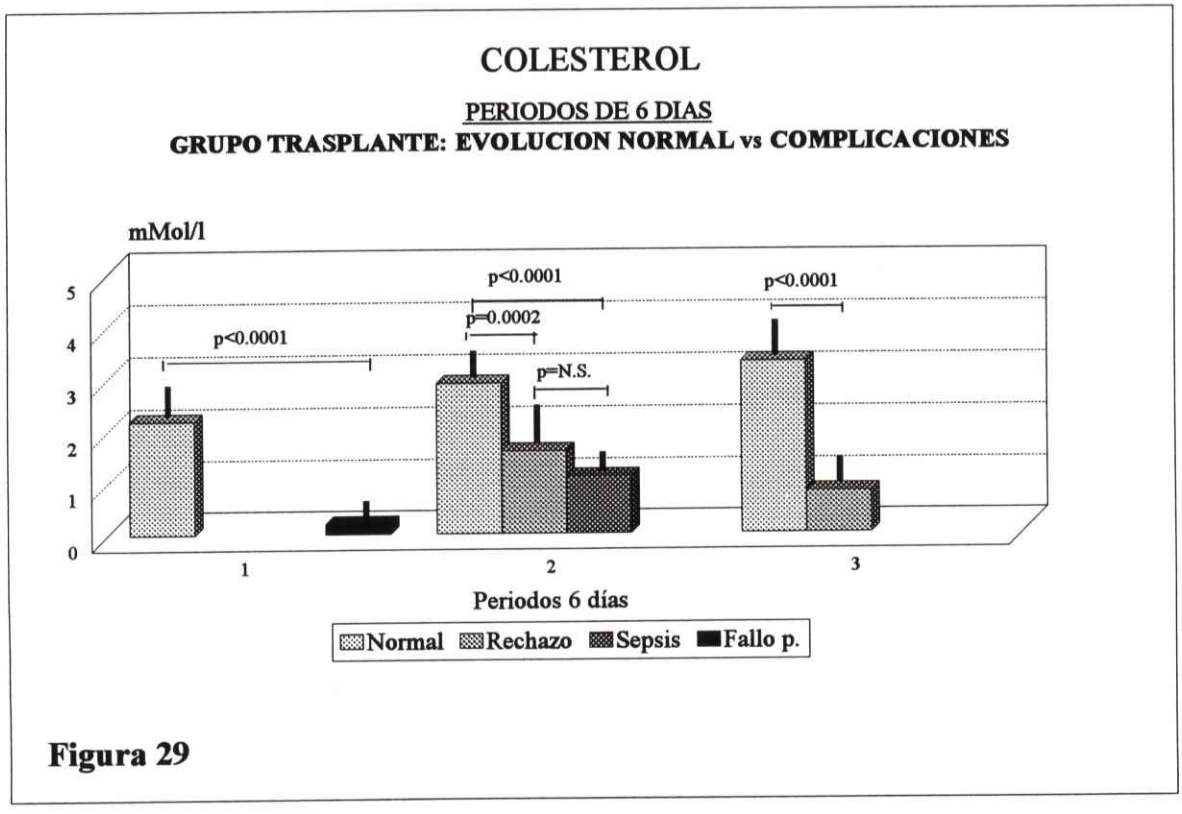


Figura 29

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

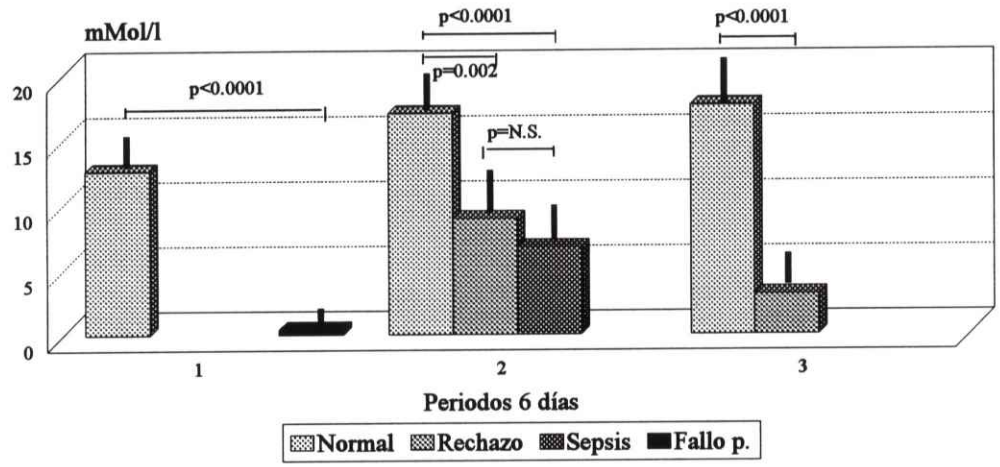


Figura 30

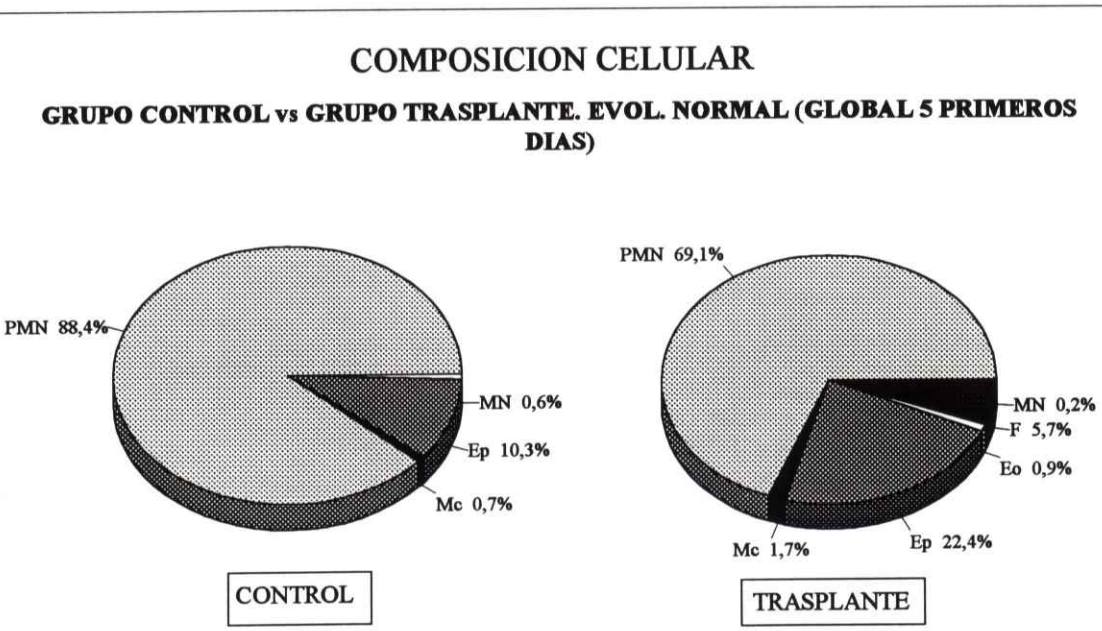


Figura 31

UNIVERSIDAD DE MURCIA

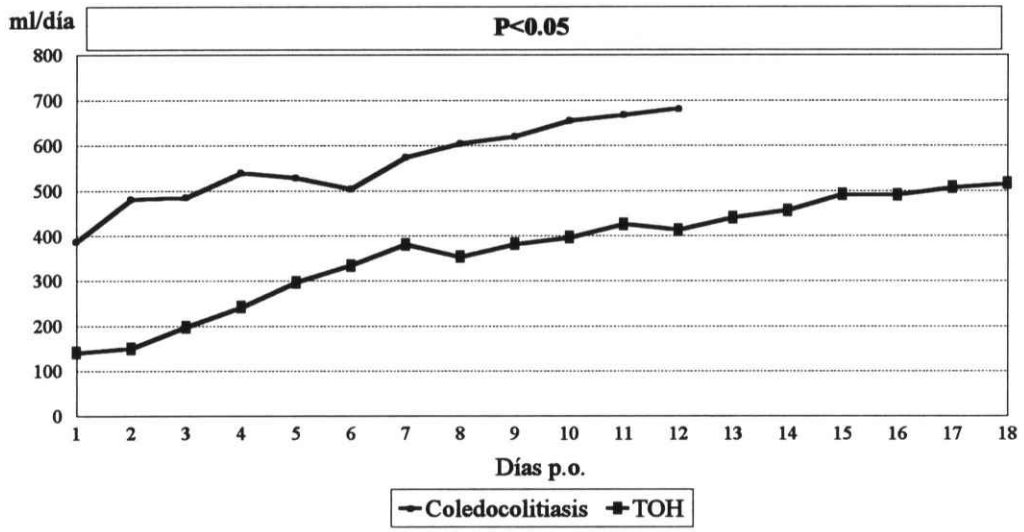


Figura 32

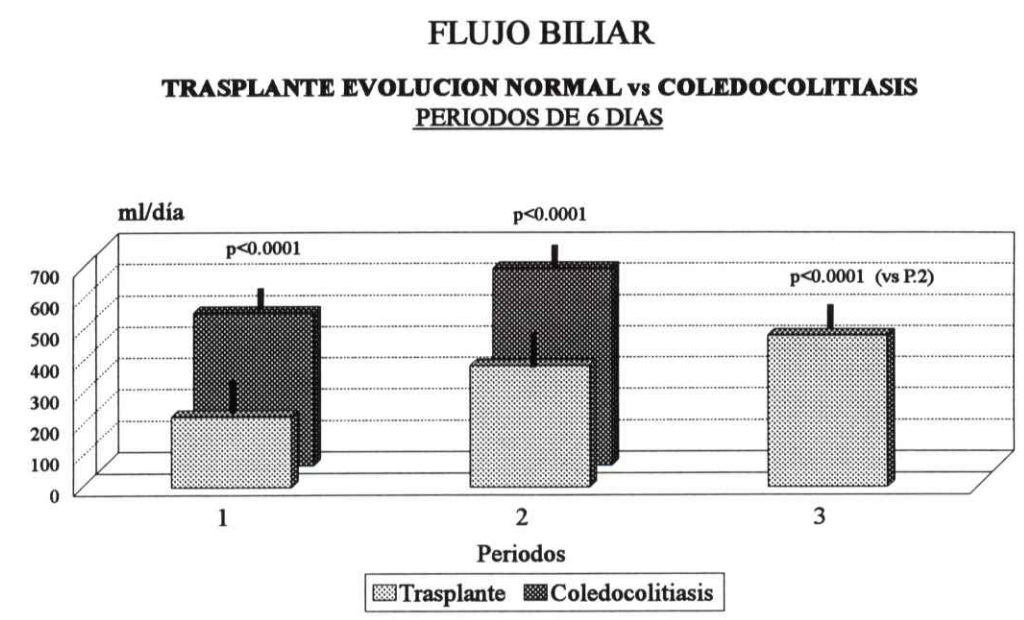


Figura 33

UNIVERSIDAD DE MURCIA

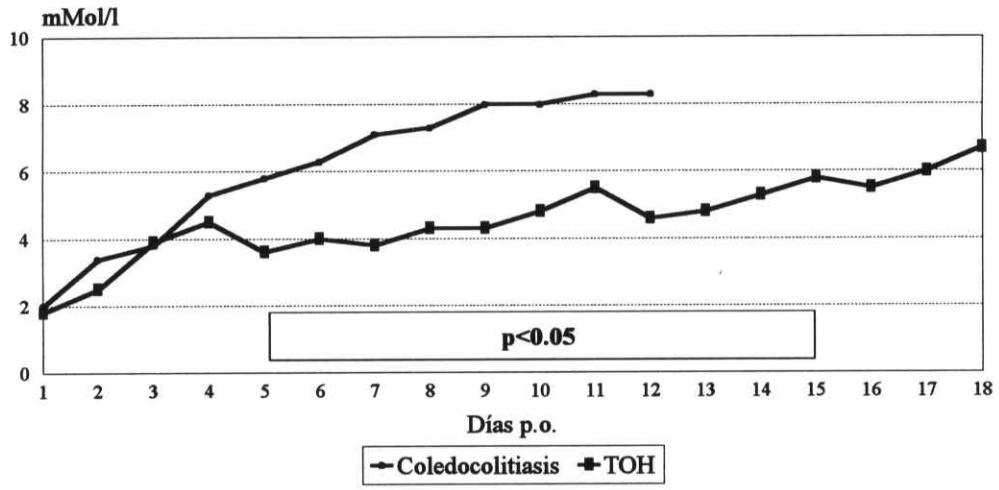


Figura 34

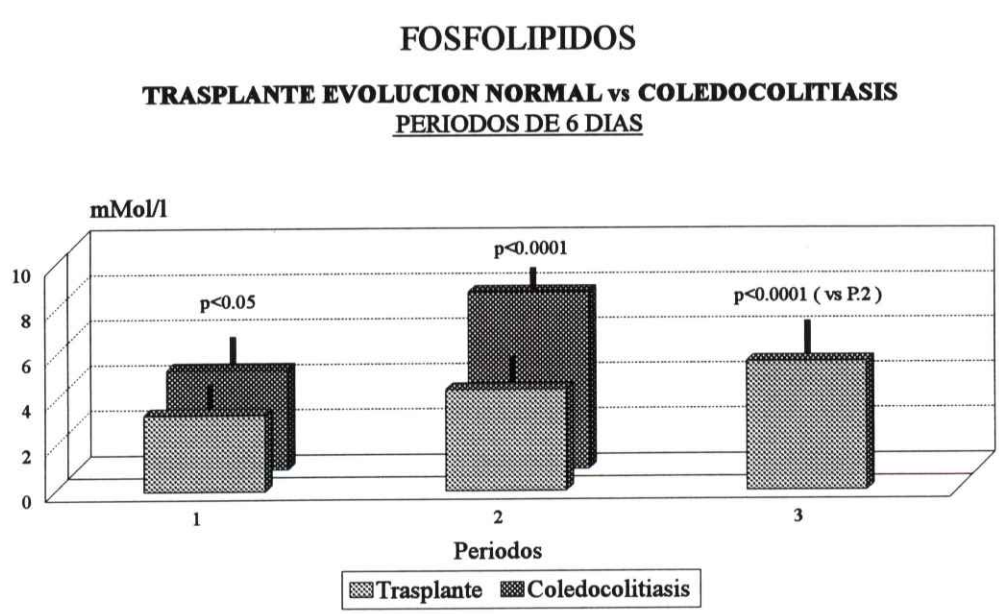


Figura 35

UNIVERSIDAD DE MURCIA

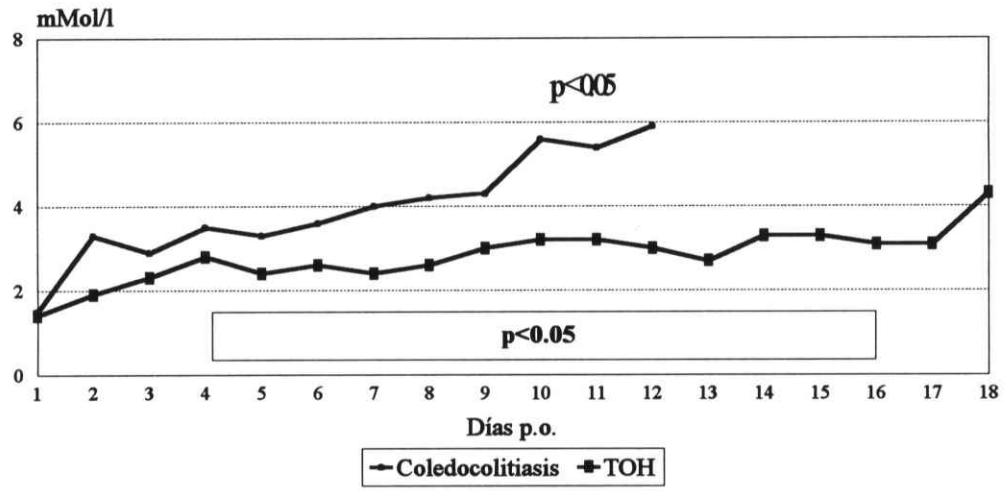


Figura 36

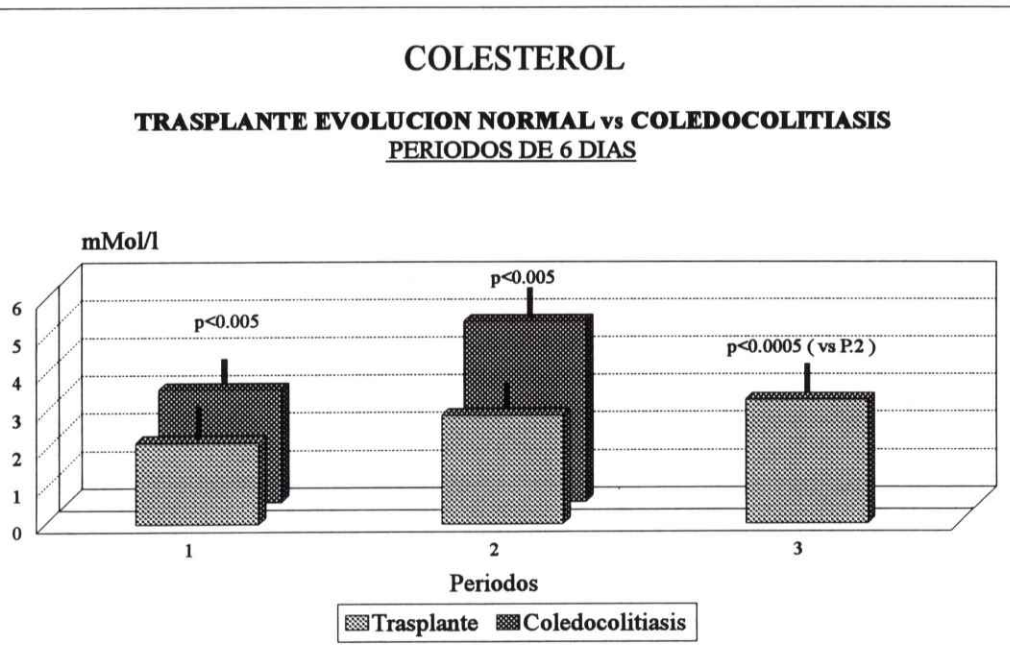


Figura 37

UNIVERSIDAD DE MURCIA

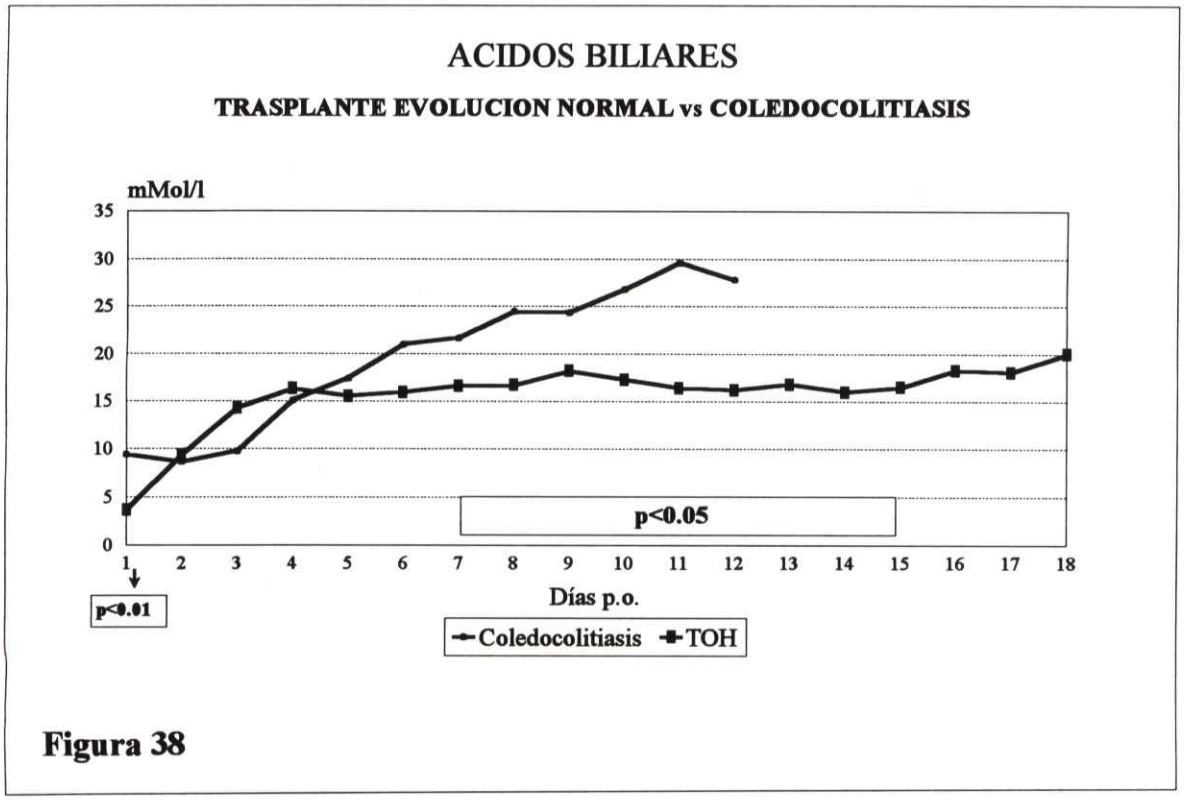


Figura 38

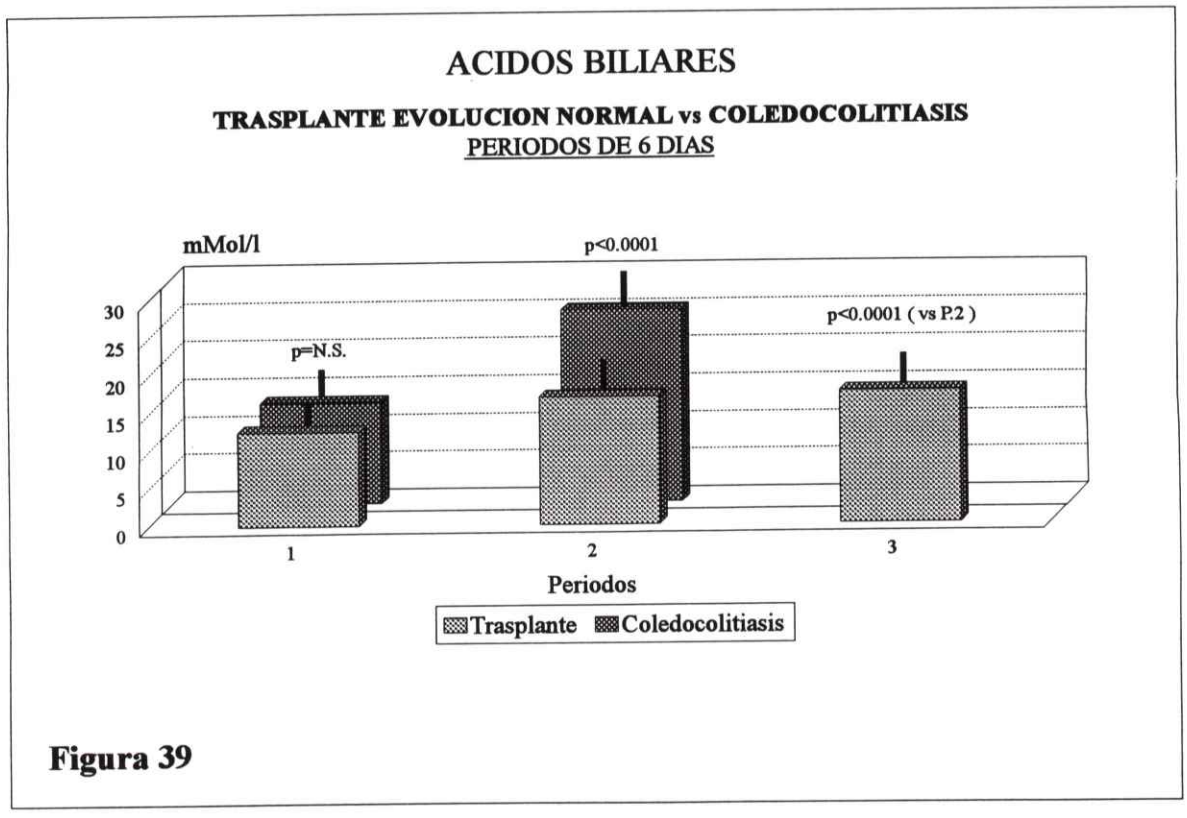


Figura 39

UNIVERSIDAD DE MURCIA