

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**DRENAJE BILIAR INTERNO *VERSUS* ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL-ALFA SOBRE LAS ALTERACIONES DE LA
INMUNIDAD CELULAR EN LA ICTERICIA OBSTRUCTIVA
EXPERIMENTAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inmaculada Segura Jiménez

Bajo la dirección de los doctores

D. Francisco Javier Padillo Ruíz

D. Jordi Muntané Relat

D. Fernando Docobo Durántez

Sevilla, 2015

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL
SEVILLA 2015

DRENAJE BILIAR INTERNO *VERSUS* ANTICUERPOS ANTI-
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL–ALFA SOBRE LAS
ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR EN LA ICTERICIA
OBSTRUCTIVA EXPERIMENTAL

Doctorando: Inmaculada Segura Jiménez

Directores: Francisco Javier Padillo Ruíz

Jordi Muntané Relat

Fernando Docobo Durántez

D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUÍZ, CATEDRÁTICO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA; D. JORDI MUNTANÉ RELAT, SUBDIRECTOR I+D+I DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA INTERCENTRO CIRUGÍA GENERAL Y DIGESTIVA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA-VIRGEN DEL ROCÍO Y D. FERNANDO DOCOBO DURÁNTEZ, PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

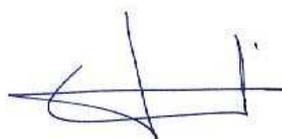
CERTIFICAN: Que Doña Inmaculada Segura Jiménez ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada: **“DRENAJE BILIAR INTERNO VERSUS ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA SOBRE LAS ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR EN LA ICTERICIA OBSTRUCTIVA EXPERIMENTAL”**

Considerando esta memoria finalizada, reúne las condiciones necesarias para obtener el grado de Doctor, por lo que autorizamos la presentación de la misma para su defensa y calificación por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, expiden el siguiente certificado en Sevilla a de Mayo de 2015



Fdo. Francisco Javier Padillo Ruíz



Fdo. Jordi Muntané Relat



Fdo. Fernando Docobo Duránte

Quisiera agradecer a mis directores de Tesis la oportunidad de haber terminado este trabajo que comencé siendo Residente de Cirugía en el Hospital Reina Sofía de Córdoba

A D. Fernando Docobo siempre dispuesto a colaborar, a D. Jordi Muntané, investigador incansable y especialmente a D. Javier Padillo, persona brillante y emprendedora, con quien he tenido el privilegio de trabajar

A Javier Serrano, inmunólogo, sin tu ayuda no podría haber realizado este trabajo

A los que fueron compañeros Residentes y Adjuntos de Córdoba, a mis compañeros de Puertollano y Pozoblanco, de todos guardo un gran recuerdo

A mis actuales compañeros del Servicio de Cirugía General del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, donde voy feliz a trabajar

A mis padres y hermanos. A mi suegra Angelitas y a mi cuñada Mónica

A Alfonso, mi compañero en esta aventura que es vivir

A nuestros hijos, Alfonso y Ángel, dos pequeñas personitas por las que intentamos cada día ser un poco mejores

“Las gentes de buena presencia son agradables de ver; pero los que nos dejan una dolorosa ausencia sí que eran una parte de nuestra vida”

Vicente Segura

ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BT	Bilirrubina total
CD	Del inglés <i>Cluster of differentiation</i> , grupos de diferenciación
CID	Coagulación intravascular diseminada
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , técnica de enzimo inmuno ensayo
FAlc	Fosfatasa alcalina
Fc	Fracción cristalizable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
FL	Fluorescencia
FITC	Fluoresceína
γGT	Gamma glutamiltranspeptidasa
g:	Gramo
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IO	Ictericia obstructiva
IP	Intraperitoneal

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NK	Del inglés <i>Natural Killer</i> , células T asesinas naturales
NOI	Índice normal oxidativo
PBMC	Del inglés <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PGE1	Prostaglandina E1
pg	Picogramo
PMA	Phorbol 12-myristato 13-acetato
RPE	R-Ficoeritrina
rpm	Revoluciones por minuto
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
sTNFr	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral
TCR	Receptor celular de los linfocitos T
Th	Linfocito T <i>helper</i> o cooperador
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa

UI	Unidades Internacionales (unidad de actividad enzimática)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micra
vs	<i>versus</i>

INTRODUCCIÓN	19
I. CONCEPTOS GENERALES	20
I. 1. Papel del hígado en la defensa del organismo	20
I. 1. 1. Peculiaridades de la circulación hepática	
I. 1. 2. Células no parenquimatosas del hígado	
I. 1. 2. a. Células de Kupffer	
I. 1. 2. a. 1. Actividad fagocítica	
I. 1. 2. a. 2. Actividad inmunomoduladora	
I. 1. 2. a. 3. Secreción de citoquinas. El TNF-α	
I. 1. 2. b. Células NK	
I. 2. La barrera mucosa intestinal	31
I. 2. 1. Endotoxemia	
I. 2. 2. Translocación bacteriana	
I. 2. 3. El sistema inmunosecretor del intestino	
I. 2. 4. La circulación enterohepática de las sales biliares	
II. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN EN LA ICTERICIA OBSTRUCTIVA	39
II. 1. Disfunción de la barrera mucosa intestinal en la ictericia obstruktiva experimental	41
II. 1. 1. Endotoxemia en la ictericia obstruktiva	

II. 1. 2. Translocación bacteriana en la ictericia obstructiva	
II. 2. Alteraciones de la inmunidad en la ictericia obstructiva experimental	48
II. 2. 1. Alteraciones de la inmunidad local	
II. 2. 2. Alteraciones en la respuesta inmune sistémica	
II. 2. 2. a. Respuesta inmune inespecífica	
II. 2. 2. b. Respuesta inmune específica	
II. 3. Papel del TNF-α	56
III. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO	59
III. 1. Drenaje biliar	59
III. 2. Anticuerpos anti-TNF	62
HIPÓTESIS DE TRABAJO	65
OBJETIVOS	68

I. Objetivo principal**II. Objetivos específicos****MATERIAL Y MÉTODO 70****I. Animales de experimentación 71****I. 1. Cuidados y normativa****II. 2. Anestesia y preparación prequirúrgica****II. Grupos experimentales 73****III. Técnica quirúrgica 75****III. 1. Ligadura del conducto biliar****III. 2. Drenaje biliar interno****IV. Administración de anticuerpos anti-TNF 79****V. Sacrificio y obtención de muestras 80****VI. Determinaciones 82****VI. 1. Variables principales**

VI. 1. 1. Mediadores celulares de la respuesta inmune**VI. 1. 1. a.** Aislamiento de las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)**VI. 1. 1. b.** Subpoblaciones leucocitarias y grado de activación**VI. 2. Variables secundarias****VI. 2. 1.** Análisis de la capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos**VI. 2. 1. a.** Rodamina**VI. 2. 1. b.** Tuftsin**VI. 2. 2.** Mediadores solubles de la respuesta inmune: niveles de TNF- α en sangre periférica**VI. 2.3.** Determinación de endotoxinas en sangre periférica**VI.2. 4.** Estudio microbiológico de la bilis**VI. 2. 4.a.** Siembra y medios de cultivo**VI. 2. 4. b.** Lectura y valoración**VI. 3. Variables complementarias****VI.3. 1.** Parámetros bioquímicos: daño hepatocelular y colestasis

RESULTADOS	95
I. Efectos biológicos observados en la ictericia obstructiva experimental tras 14 y 21 días de obstrucción biliar	96
I. 1. Lesión hepatocelular y colestasis	
I. 2. Inmunidad celular específica	
I. 3. Inmunidad celular inespecífica	
I. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Rodamina y Tuftsina	
I. 5. Niveles de TNF-α en sangre periférica	
I. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica	
I. 7. Estudio microbiológico de la bilis	
II. Efectos del drenaje biliar interno en la ictericia obstructiva experimental	106
II. 1. Lesión hepatocelular y colestasis	
II. 2. Inmunidad celular específica	

II. 3. Inmunidad celular inespecífica**II. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y****Macrófagos: Rodamina y Tuftsina****II. 5. Niveles de TNF- α en sangre periférica****II. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica****II. 7. Estudio microbiológico de la bilis****III. Efectos de los anticuerpos anti-TNF en la ictericia obstructiva experimental114****III. 1. Lesión hepatocelular y colestasis****III. 2. Inmunidad celular específica****III. 3. Inmunidad celular inespecífica****III. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y****Macrófagos: Rodamina y Tuftsina****III. 5. Niveles de TNF- α en sangre periférica****III. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica****III. 7. Estudio microbiológico de la bilis**

IV. Anticuerpos anti-TNF-α vs drenaje biliar interno en la ictericia obstructiva experimental	122
IV. 1. Lesión hepatocelular y colestasis	
IV. 2. Inmunidad celular específica	
IV. 3. Inmunidad celular inespecífica	
IV. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Rodamina y Tuftsina	
IV. 5. Niveles de TNF-α en sangre periférica	
IV. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica	
IV. 7. Estudio microbiológico de la bilis	
DISCUSIÓN	130
I. Análisis del método de investigación: ictericia obstructiva experimental e inmunodepresión	131
II. Impacto del drenaje biliar interno sobre las alteraciones de la respuesta inmunológica en la ictericia obstructiva experimental	134

III. Impacto de los anticuerpos anti-TNF sobre las alteraciones de la respuesta inmunológica en la ictericia obstructiva experimental	137
--	------------

CONCLUSIONES	141
---------------------------	------------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
---	------------

INTRODUCCIÓN

I. CONCEPTOS GENERALES

I. 1. Papel del hígado en la defensa del organismo

I. 1. 1. Peculiaridades de la circulación hepática

El hígado ocupa un lugar estratégico en el cuerpo humano, al quedar interpuesto entre el tubo digestivo y la circulación general. Aproximadamente un 75 por 100 de su aporte sanguíneo procede de la vena porta, y por ello recibe de la sangre portal todos los productos absorbidos en el tubo intestinal, que luego son metabolizados en el hígado o transformados por él y devueltos a la sangre para el almacenamiento o la utilización en otros órganos.

El 25 por 100 restante de su irrigación la recibe de la arteria hepática, y ya en el interior del parénquima, la sangre fluirá por las sucesivas ramificaciones de los vasos portales y arteriales hasta alcanzar los sinusoides hepáticos.

Los sinusoides hepáticos forman un complejo plexo tridimensional en el que sus células limitantes están casi directamente adheridas a las células del parénquima, con las que solo se interpone un estrecho espacio perivascular o espacio perisinusoidal de Disse, demostrado por el microscopio electrónico en el hígado normal ¹.

Las células endoteliales constituyen la mayor parte del revestimiento de los sinusoides. Son células aplanadas que forman una membrana con fenestraciones inter o

transcelulares de 0,1 a 0,5 μm de ancho, aunque no permiten la libre difusión de partículas entre la sangre y la cara sinusoidal de los hepatocitos, sino que constituyen una barrera entre las macromoléculas o los leucocitos que circulan por la luz del sinusoides y los hepatocitos. Además, poseen una gran capacidad endocítica mediante el mecanismo mediado por receptor, pueden funcionar como células presentadoras de antígeno para linfocitos T CD4 y CD8 y tienen capacidad de segregar citoquinas mediadoras de la respuesta inflamatoria.

Cada célula hepática quedará expuesta en al menos una, y de ordinario en dos de sus caras, a las células endoteliales sinusoidales. El acceso directo a la superficie de los hepatocitos es un rasgo estructural de gran importancia fisiológica para el intercambio activo de metabolitos entre el hígado y el torrente sanguíneo, no sólo de aquellos absorbidos en la digestión, sino también de las sustancias tóxicas, las bacterias y sus toxinas procedentes de la luz intestinal o de la circulación general ^{2,3}.

Además de las células endoteliales, se han identificado otros tipos celulares asociados con los sinusoides: las células de Kupffer, las células perisinusoidales almacenadoras de grasa y las células del hoyo o "pit cells", células con actividad NK específicas del hígado. De éstas y de las células de Kupffer se hablará con mayor detalle más adelante.

Trabajos más recientes sugieren una cuarta población celular asociada a los sinusoides, las células de las fosillas localizadas en el espacio persinusoidal, con origen y funciones por determinar ¹.

I. 1. 2. Células no parenquimatosas del hígado

En contraste con los hepatocitos, que ocupan casi el 80 por 100 del volumen total hepático y realizan la mayoría de sus funciones, las células no parenquimatosas constituyen menos de un 7 por 100 de este volumen global, pero representan el 40 por 100 de la población celular del hígado.

Se localizan en el espacio sinusoidal y cada vez más se reconoce su papel en la regulación de las distintas funciones de los hepatocitos .

I. 1. 2. a. Células de Kupffer

Las células de Kupffer son macrófagos tisulares, último eslabón o elemento maduro del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). Se localizan en los sinusoides, donde pueden estar fijos o móviles entre las células endoteliales. Proceden de los monocitos de sangre periférica que han emigrado del endotelio debido a la presencia de sustancias quimiotácticas presentes en el suero o liberadas por linfocitos activados o por microorganismos ⁴.

La mayor parte de su superficie celular está en contacto con la sangre de la luz del sinusoides. Constituyen aproximadamente una tercera parte de las células no parenquimatosas del hígado y hasta un 85 por 100 de la población celular del SFM ⁵.

Pueden sobrevivir durante meses y tienen capacidad de multiplicarse localmente, propiedad que no pierden al madurar. Su situación clave en la confluencia del drenaje

venoso portal convierte a estas células en los primeros responsables del secuestro y eliminación de antígenos celulares, endotoxinas y microorganismos liberados desde el tracto intestinal, metabolizándolos o haciéndolos más inmunógenos.

I. 1. 2. a. 1. Actividad fagocítica

Las células de Kupffer poseen una pronunciada capacidad endocítica y fagocítica. Junto a los neutrófilos, son las principales células fagocitarias, para lo que cuentan con una adecuada dotación de enzimas hidrolíticas, que emplean en la digestión de las partículas fagocitadas.

Con el propósito de evaluar la actividad fagocítica de las células de Kupffer, se han utilizado diversos métodos que determinan la capacidad de aclaramiento de partículas como el carbono coloide, microagregados de albúmina o bacterias marcadas, mediante su inyección intravenosa y posterior determinación del ritmo de desaparición en sangre, o por medio de técnicas directas de perfusión hepática *in situ*^{5,6,7}. La capacidad de aclaramiento es un proceso complejo que depende de la concentración de la sustancia, el flujo sanguíneo y propiedades físico-químicas específicas.

Aunque los macrófagos tisulares comparten el origen, características morfológicas y funciones comunes, y en general responden a los mismos estímulos externos, las células de Kupffer son peculiares en algunos aspectos: mantienen un permanente grado de activación debido a las pequeñas cantidades de endotoxinas que continuamente penetran a través de la mucosa gastrointestinal intacta y son un componente habitual de la sangre de la vena porta, lo que provocaría una hipersecreción de TNF y otras citoquinas mediadoras de la inflamación por las células de Kupffer⁸. Sin embargo, esta secreción se encuentra inhibida probablemente por un mecanismo mediado por la prostaglandina E2. Este mecanismo de

“*downregulation*”, junto a otros que expondré más adelante, protegería de los efectos deletéreos que conllevaría la activación incontrolada de la cascada inflamatoria⁹⁻¹¹.

No obstante, la fagocitosis por las células de Kupffer no es el principal mecanismo por el cual los microorganismos que alcanzan el hígado a través del torrente sanguíneo son eliminados; más bien esta eliminación depende de la compleja interacción entre las células de Kupffer y los neutrófilos que rápidamente y de forma masiva migran hacia el hígado y se sitúan junto a los macrófagos en respuesta a la infección. Por ello, la acumulación de neutrófilos en los sinusoides hepáticos es característica en los estados de endotoxemia y sepsis.

Las acciones de los neutrófilos incluyen la fagocitosis, la producción de metabolitos tóxicos y la liberación de enzimas proteolíticas. Aunque estas funciones facilitan la eliminación de microorganismos invasores, también pueden provocar graves daños tisulares locales. La eliminación a tiempo de neutrófilos inflamatorios secuestrados en el hígado durante los períodos transitorios de bacteriemia o endotoxemia previene de la exagerada respuesta inflamatoria observada en el síndrome de disfunción multiorgánica.

Así, el aclaramiento de los neutrófilos que han migrado a los sinusoides hepáticos es necesario para la resolución del proceso inflamatorio, y esto sucede más que por su retorno al torrente circulatorio, a su muerte celular programada o apoptosis. Es entonces cuando las células de Kupffer mediante la expresión de receptores de superficie celular reconocen y fagocitan los neutrófilos apoptóticos, eliminándolos^{12, 13}.

Aunque las células de Kupffer están presentes en todo el hígado, son más abundantes en la región periportal del acino hepático; del mismo modo, en esta localización

son de mayor tamaño y poseen mayor actividad endocítica y enzimática lisosomal, y mayor capacidad de secreción de citoquinas .

En general, las células endoteliales asimilan partículas solubles vía pinocitosis y las células de Kupffer vía fagocitosis. El hígado representa el primer lugar donde son eliminados de la circulación complejos solubles de Inmunoglobulina G, principalmente por las células de Kupffer, y en menor grado por las células endoteliales. Las células de Kupffer reconocen mediante receptor el dominio Fc o fracción cristalizante de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, resultando la fagocitosis inespecífica de inmunocomplejos y partículas como microorganismos y células eucariotas unidos a anticuerpos¹⁴ .

I. 1. 2. a. 2. Actividad inmunomoduladora

La expresión de receptores Fc proporciona a las células de Kupffer un papel significativo en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica.

Como reguladores de la respuesta inmune, las células de Kupffer intervienen tanto en su vertiente celular como humoral, induciendo o suprimiendo dicha respuesta. Controlan la concentración de antígeno por su fagocitosis y destrucción, fijándolo en su superficie o interiorizándolo sin degradarlo y posteriormente exteriorizándolo lenta y gradualmente, y actúan junto a las células endoteliales sinusoidales y a las células dendríticas residentes en los sinusoides como células presentadoras de antígeno para los linfocitos circulantes.

Las células de Kupffer procesan el antígeno de forma que sea eficaz en caso de que exista poca cantidad de éste, y lo presentan en su superficie para que sea accesible a los receptores de los linfocitos B y T CD4⁺ y CD8⁺ ^{1,15}.

Tras su activación por los distintos estímulos bacterianos, las células de Kupffer segregarán citoquinas que van a jugar un papel clave en la modulación de la diferenciación y proliferación de otras células inmunitarias. En respuesta a concentraciones fisiológicas de endotoxinas, rápidamente segregan TNF- α e IL-10, regulando la actividad presentadora de antígeno y expresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II por las células endoteliales y células dendríticas de los sinusoides hepáticos, disminuyendo la activación de los linfocitos T. Las células de Kupffer también segregan prostanoïdes, óxido nítrico y reactivos intermediarios del oxígeno inhibiendo asimismo la activación de las células T ¹⁶.

Mediante estas acciones, es posible la *inmunotolerancia* de pequeñas cantidades de endotoxinas que continuamente alcanzan la circulación portal. Pero al mismo tiempo, las células de Kupffer participan eficazmente en la defensa contra los microorganismos invasores: a través de la secreción de las citoquinas IL-12 e IL-18 regulan la diferenciación de las células NK y la proliferación local de subpoblaciones de células NK citotóxicas productoras de IFN- γ . Otras citoquinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α y leucotrienos promueven la infiltración y actividad antimicrobiana de neutrófilos, y la activación de otras células inmunitarias como los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

I.1. 2. a. 3. Secreción de citoquinas. El TNF- α .

Además de factores que regulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos, los macrófagos tienen la capacidad de segregar citoquinas que actúan como mediadores y reguladores químicos de la inflamación.

Las citoquinas son pequeños péptidos entre los que se incluyen interleuquinas, el TNF, factores de crecimiento e interferones. Son sintetizadas y segregadas por diferentes tipos celulares inmunocompetentes como linfocitos y monocitos-macrófagos en respuesta a la lesión, la inflamación o la infección ¹⁷.

El TNF juega un papel protagonista en la respuesta a la agresión, especialmente en la respuesta inflamatoria a la endotoxemia ¹⁸. Su estimulación o activación prolongada provocaría una liberación incontrolada de otras citoquinas proinflamatorias que perpetuarían sus efectos biológicos, y podría desencadenar las alteraciones metabólicas, hemodinámicas y patológicas propias del síndrome de disfunción multiorgánica ¹⁹⁻²¹.

Las células de Kupffer son la principal fuente de TNF. Además de este TNF clásico derivado de los macrófagos o TNF- α , se ha identificado un factor citotóxico derivado de linfocitos T estimulados con mitógenos o antígenos específicos, al que se ha denominado linfotóxina o TNF- β .

Comparten receptores comunes y una homología en su secuencia de aminoácidos del 28 % en humanos y del 35 % en roedores ²². En adelante, nos referiremos al primero.

Las endotoxinas, lipopolisacárido que forma parte de la pared celular de las bacterias gramnegativas, son el estímulo más estudiado en la secreción de TNF. Otros productos de

bacterias grampositivas, virus, parásitos y citoquinas como interleuquina-1, interleuquina-2, factores estimuladores de colonias y el propio TNF, pueden inducir su secreción ²³.

Asimismo, existen varios reguladores de la síntesis como el factor de crecimiento tisular β , los glucocorticoides y la prostaglandina E2 ²⁴.

El TNF- α puede encontrarse unido a receptores de membrana o de forma libre o secretada. Ambas formas pueden ser biológicamente activas y tienen efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares.

Se conocen dos tipos de receptores del TNF, que se han clasificado en función de su peso molecular en TNF-R2 o TNF-A y TNF-R1 o TNF-B, de 75 y 55 kDa respectivamente.

Los hepatocitos expresan ambos tipos de receptores y aumentan dicha expresión en situaciones de inflamación aguda o crónica ²⁵. Otras células diana del TNF son las células endoteliales, los monocitos-macrófagos, los fibroblastos, miocitos y adipocitos.

La denominación de receptores solubles del TNF (sTNFr) se refiere al dominio extracelular de éstos. Se han detectado en el suero y orina de humanos sanos y se desprenden de la membrana celular en los procesos inflamatorios ^{26, 27}.

La existencia de estos receptores podría representar un mecanismo de protección frente a los efectos citotóxicos del TNF. En estudios experimentales se ha observado que la administración de TNF induce la liberación de estos receptores solubles y la administración de tratamientos anti-TNF como lactulosa oral o anticuerpos anti-TNF- α , produce el efecto

contrario. Actuarían como inhibidores naturales que forman complejos biológicamente inactivos con el TNF^{28, 29}.

El complejo sTNFr-TNF tiene una vida media mayor que el TNF solo y su aclaramiento sanguíneo depende de la función renal^{17, 30, 31}.

De este modo, la liberación de los sTNFr durante situaciones de producción excesiva de TNF actuaría protegiendo de los efectos nocivos de esta citoquina y, a su vez, funcionarían como un reservorio de liberación lenta que prolongaría en el tiempo los efectos del TNF³².

I. 1. 2. b. Células NK

Los linfocitos nulos o células nulas constituyen el 15 % de los linfocitos de sangre periférica y reciben este nombre porque no poseen los marcadores propios de los linfocitos T o B. Engloban dos subpoblaciones, las células NK (*natural killer* o asesinas naturales) y las células K (*killer* o asesinas).

Clásicamente, la presencia de linfocitos en el hígado se asociaba a estados de infección o inflamación, pero también en situación de normalidad el hígado sano adulto alberga poblaciones de linfocitos que tienen características fenotípicas y funcionales particulares, ya que existe un predominio de células NK junto a otros linfocitos con actividad NK y en conjunto constituyen el 65 % de la población linfoide hepática, lo que sugiere el papel clave del hígado como lugar de encuentro entre el sistema inmunitario innato o inespecífico con los antígenos que alcanzan la circulación portal³³.

Las originariamente llamadas células del hoyo o *pit cells*, son las células NK específicas del hígado. Morfológicamente, se trata de linfocitos granulares grandes que se localizan en la luz del sinusoides, donde se encuentran adheridos a las células endoteliales y las células de Kupffer.

Poseen una actividad citotóxica natural frente a diferentes líneas celulares tumorales o transformadas por virus, sin que intervengan anticuerpos y sin sensibilización previa.

Adyacentes a las células del hoyo, el hígado adulto alberga otras subpoblaciones de linfocitos T que también presentan actividad NK.

El desarrollo de métodos de aislamiento y cultivo *in vitro* de las diferentes poblaciones no parenquimatosas y parenquimatosas del hígado, ha permitido conocer la secreción por los distintos tipos celulares de sustancias como el óxido nítrico, endotelina-1, leucotrienos, interleuquinas, TNF- α y otras, con acción autocrina y paracrina, que actuarían regulando las funciones de las células vecinas^{2, 34}.

Junto a las células de Kupffer, las células NK hepáticas podrían representar la primera línea de defensa frente al implante de células metastásicas procedentes de la circulación portal o sistémica en el hígado^{35, 36}.

I. 2. La barrera mucosa intestinal

El intestino alberga un gran número de bacterias y de especies microbianas, en su mayoría en el intestino grueso. Las bacterias residentes que constituyen la microflora intestinal normal se encuentran por lo general adheridas a las células epiteliales de la mucosa, en nichos ecológicos a lo largo del tubo intestinal, donde se multiplican permanentemente e impiden el sobrecrecimiento de otras bacterias patógenas³⁷.

Al mismo tiempo, existe una abundante flora transeúnte que procede del medio ambiente, de la alimentación o de tramos superiores del tubo digestivo, que se encuentra libre en la luz intestinal o asociada con partículas y restos alimentarios. Transita pasivamente y en condiciones normales es incapaz de fijarse y establecerse, y es eliminada al exterior.

La mucosa intestinal representa, en consecuencia, una gran superficie que ha de ser protegida contra la invasión. Esta protección implica la conjunción de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos que se agrupan bajo el término de *barrera mucosa intestinal*³⁸⁻⁴⁰.

Entre los mecanismos inmunológicos se encuentra la población de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos que se localizan en la lámina propia intestinal y forman parte del sistema MALT. Serían los encargados de una parte, reconocer los antígenos extraños e impedir la invasión por microorganismos patógenos, y de otra, tolerar la colonización por las bacterias comensales y permitir el paso de los nutrientes a través del epitelio intestinal.

Entre los mecanismos no inmunológicos se encuentran las condiciones físico-químicas del medio, como son la tensión de oxígeno y el potencial de óxido-reducción; el peristaltismo intestinal, la presencia en la luz del tubo digestivo de sustancias inhibidoras ⁴¹, ⁴² y la propia capacidad de regeneración del epitelio intestinal ⁴³.

De este modo, el tracto gastrointestinal es considerado no solo un órgano que participa en la progresión y absorción de los nutrientes, sino que actúa como barrera física y defensa inmunológica del organismo.

Además de estos factores del huésped, la microflora intestinal es considerada uno de los mecanismos protectores más eficaces ³⁷, impidiendo o dificultando la colonización microbiana de otras especies exógenas, en especial las patógenas.

De la interacción de las distintas especies de la microflora entre sí y con el epitelio intestinal y el sistema inmune del huésped, resulta esta acción sinérgica que puede ser debida a diversos fenómenos, como la competición por un sustrato nutritivo o por un receptor celular, la modificación de las condiciones físico-químicas o la producción de sustancias inhibidoras.

Ya en 1959 Fine *et al.* introdujeron el concepto de sepsis de origen intestinal, considerando que la disfunción de la barrera mucosa permitiría el paso de bacterias y sus toxinas desde la luz del tubo digestivo a tejidos distantes normalmente estériles ⁴⁴. Actualmente este fenómeno se conoce como *translocación bacteriana*, y se ha comprobado en estudios clínicos y modelos experimentales, mediante el cultivo de enterobacterias en sangre periférica, ganglios linfáticos mesentéricos y tejidos y órganos más lejanos como el hígado y el bazo ⁴⁵.

El mecanismo exacto de la translocación no se conoce. Se ha observado mediante microscopio electrónico que las bacterias pueden atravesar células epiteliales intactas y sin embargo este fenómeno no se produce a nivel de las uniones intercelulares de los enterocitos. Después de atravesar la pared intestinal, las bacterias logran alcanzar órganos distantes vía linfática o a través de la sangre portal. No obstante, el fenómeno de la translocación no implica necesariamente infección y enfermedad.

I. 2. 1. Endotoxemia

Las endotoxinas son sustancias tóxicas y con propiedades antigénicas, que forman parte del lipopolisacárido (LPS) que constituye la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gramnegativas. Se pueden liberar durante la fase de crecimiento, pero sobre todo se liberan durante la lisis de la célula bacteriana.

Normalmente, se producen pequeñas cantidades de endotoxinas a partir de la flora Gramnegativa del tubo digestivo, que por vía portal llegan al hígado donde rápidamente son captadas por las células de Kupffer, que las metabolizan e inician una respuesta inflamatoria sistémica mediante la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias, fundamentalmente TNF e IL-6.

En modelos experimentales ^{9, 43}, la administración de endotoxinas produce manifestaciones biológicas como fiebre, alteraciones en el recuento celular de leucocitos y plaquetas y alteraciones vasculares que son semejantes para todas las bacterias gramnegativas, pero difieren según la dosis y especie animal. El hombre presenta la máxima sensibilidad a la endotoxemia, sensibilidad que aumenta con la edad.

I. 2. 2. Translocación bacteriana

La translocación bacteriana se define como el paso de bacterias endógenas viables desde el tracto gastrointestinal hacia localizaciones extraintestinales normalmente estériles, donde sobreviven.

El intestino contiene una gran cantidad de bacterias potencialmente patógenas y letales, por lo que para que la translocación se produzca, debe producirse una disrupción de los numerosos mecanismos fisiológicos de defensa.

La colonización del intestino por microorganismos anaerobios obligados no patógenos impide la adhesión a la mucosa de otras especies y disminuye el sobrecrecimiento bacteriano ³⁷. Alteraciones en la composición de la flora intestinal como resultado del uso de antibióticos, el estasis intestinal o una nutrición inadecuada pueden desencadenar la translocación.

La mucosa intestinal, normalmente una eficiente barrera, puede sufrir un incremento de su permeabilidad fisiológica a consecuencia de un daño directo sobre los enterocitos o por disminución del flujo sanguíneo intestinal. Las bacterias que logran atravesar el epitelio intestinal serán fagocitadas por la defensa inmunológica local.

La disfunción de esta defensa inmunológica local, junto a la lesión física de la mucosa y la alteración de la microflora bacteriana normal, son los principales mecanismos que promotores de la translocación.

Las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias intestinales y participan en la regulación de la homeostasis de la microflora intestinal. De igual modo, su ausencia de la luz intestinal puede originar modificaciones en la flora endógena bacteriana, promoviendo el sobrecrecimiento de los bacilos entéricos gramnegativos, la pérdida de la integridad de la mucosa y, consecuentemente, la translocación de bacterias⁴⁶.

I. 2. 3. Sistema inmunosecretor del intestino

Un componente importante de la defensa inmunológica local del intestino es el denominado *sistema inmunosecretor*⁴⁷, productor de un tipo particular de anticuerpos que frenan la proliferación bacteriana, neutralizan los virus e impiden la penetración de las enterotoxinas a través del epitelio. Son las llamadas inmunoglobulinas secretorias o IgA.

La síntesis de estos anticuerpos y su liberación en la superficie de la mucosa implica la cooperación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos de la lámina propia con el epitelio.

Los antígenos de la luz intestinal que cruzan la barrera mucosa interaccionan con las células de los nódulos linfoides de la lámina propia. Los linfoblastos que han reaccionado con el antígeno emigran a los ganglios linfáticos mesentéricos donde maduran y a través de la circulación sistémica retornan a la lámina propia. Aquí se diferencian a células plasmáticas y producen el anticuerpo IgA específico frente al antígeno absorbido.

La IgA es transportada a través del epitelio por medio de un receptor glicoproteico del enterocito. De este modo, los anticuerpos secretorios son expresados en la luz del epitelio, donde interaccionan con los antígenos, las enterotoxinas y las bacterias, e impiden su adhesión a la membrana celular.

Aunque las bacterias de la flora normal pueden inducir esta respuesta inmunitaria local, con la producción de anticuerpos de acción protectora frente al ingreso de aquellos patógenos que presenten antígenos comunes o relacionados. Es un mecanismo de protección cruzada; no obstante, la flora residente se encuentra muy adaptada a la vida comensal, por lo general no produce reacciones inflamatorias ni respuesta inmune relevantes frente a ella ¹⁶.

Sin embargo, solo una pequeña parte de la IgA sintetizada por las células plasmáticas de la lámina propia es vertida a la luz del tubo digestivo. La mayor parte es llevada por la linfa hasta el conducto torácico y desde aquí a la circulación general.

En la superficie sinusoidal y mediante un mecanismo de endocitosis, los hepatocitos captan y catabolizan, entre otras proteínas, las inmunoglobulinas. Es por ello que la IgA está presente en la bilis en una concentración hasta cinco veces mayor que en el plasma ⁴⁸, y principalmente a través de la vía hepatobiliar alcanzará la luz intestinal para participar en la defensa inmunológica del intestino.

I. 2. 4. Circulación enterohepática de las sales biliares

La bilis formada en los lobulillos hepáticos es segregada a través de un sistema de canalículos y conductos biliares, que la llevan finalmente al duodeno.

Es un líquido complejo constituido principalmente por agua, ácidos biliares, lecitina y otros fosfolípidos, colesterol esterificado y otras sustancias como bilirrubina conjugada, proteínas y electrolitos.

Después del agua, cuantitativamente los ácidos biliares son su componente más importante. Producto final del metabolismo del colesterol, además de su papel en la digestión de las grasas de la dieta y la absorción de vitaminas liposolubles, se les atribuye una importante actividad antibacteriana al tener un efecto detergente o emulsificante sobre las endotoxinas, disminuyendo su absorción a través de la mucosa intestinal.

Su presencia en la luz del tubo digestivo también participa en el mantenimiento de la microflora bacteriana y su ausencia se ha relacionado con el sobrecrecimiento de bacilos entéricos gram negativos como se mencionó anteriormente ^{49, 50}.

No obstante, no todos los ácidos biliares son igualmente eficaces en este sentido. El ácido desoxicólico, producto del metabolismo de las bacterias del colon, es uno de los más potentes y mejor estudiados. Su administración oral disminuye la endotoxemia, sin embargo solo representa aproximadamente un 10 % de los ácidos biliares constituyentes de la bilis.

En condiciones normales, existe una reserva funcional de ácidos biliares que el organismo mantiene constante mediante un mecanismo de reabsorción intestinal, que sucede fundamentalmente en el íleon distal, de modo que a través de la sangre portal retornan al hígado, donde son reconjugados y nuevamente excretados a la bilis. Es la *circulación enterohepática de los ácidos biliares*, ciclo que se repite de 5 a 10 veces al día.

La pérdida fecal, aproximadamente un 5%, es compensada por la síntesis hepática. Los ácidos biliares que retornan al hígado tienen un efecto inhibitorio sobre este mecanismo fisiológico de recirculación y sobre la síntesis hepática, si bien una pérdida elevada por las heces produce el efecto contrario.

Del mismo modo, la retención y la acumulación de los ácidos biliares en el hígado en las situaciones de colestasis, produce un efecto tóxico sobre los hepatocitos mediante la inducción de apoptosis. El grado de toxicidad de los distintos ácidos biliares varía de unos a otros, y pequeños cambios en su estructura pueden modificar su potencial citotoxicidad ⁵¹.

II. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN EN LA ICTERICIA OBSTRUCTIVA

A pesar del perfeccionamiento en la técnica operatoria y el empleo de antibióticos de nueva generación, las complicaciones infecciosas continúan siendo una de las causas más frecuentes de morbimortalidad en pacientes con ictericia obstructiva, especialmente cuando son sometidos a intervenciones quirúrgicas o a procedimientos invasivos ⁵².

Existe una relación entre la ictericia obstructiva y el desarrollo de un cuadro clínico de infección sistémica, que finalmente puede desembocar en el síndrome de disfunción multiorgánica. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes no están completamente definidos. Se postula que están implicados dos elementos principales: de una parte, una alteración gradual de la capacidad funcional de Sistema Fagocítico Mononuclear, representado fundamentalmente por la población de células de Kupffer del hígado, y de otra, la translocación de bacterias y sus toxinas a través de una mucosa

intestinal que ha perdido su integridad, alcanzando la circulación portal. En el hígado, las células de Kupffer son incapaces de aclarar esta cantidad incrementada de enterobacterias y endotoxinas, que escapan hacia la circulación sistémica¹⁸⁻²¹.

Aunque se ha observado un incremento en el número global de macrófagos hepáticos, se produce una disminución en su capacidad fagocítica y, paradójicamente, la activación persistente de las células de Kupffer promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias que pueden conducir a una activación incontrolada de la cascada inflamatoria y favorecer el desarrollo del síndrome de disfunción multiorgánica.

La ausencia de bilis dentro del intestino se considera un factor iniciador de la endotoxemia portal y de la translocación bacteriana en los pacientes con ictericia. La restitución del flujo biliar hacia la luz intestinal reduce la endotoxemia y la mortalidad en modelos animales. También, progresivamente disminuyen los índices de translocación bacteriana, indicando una mejoría en la función de la barrera mucosa.

A su vez, la restauración del flujo biliar puede participar en la recuperación de la capacidad funcional del SFM. La reposición oral de las sales biliares produjo un descenso significativo de los niveles de TNF- α en ratas con ligadura de la vía biliar, a las que también se administraron endotoxinas⁵³.

Del mismo modo, la administración oral de sales biliares consiguió reducir la incidencia de disfunción renal postoperatoria y la endotoxemia en pacientes con ictericia obstructiva, probablemente por el efecto detergente de las sales biliares, inhibiendo el sobrecrecimiento bacteriano, la translocación de las bacterias y la absorción de endotoxinas.

Sin embargo, a pesar de todos estos beneficios observados mediante la restitución del flujo biliar en modelos experimentales de obstrucción biliar, estudios clínicos de pacientes con ictericia obstructiva están mostrando que el drenaje biliar preoperatorio puede incluso incrementar las complicaciones infecciosas tras la cirugía⁵⁴⁻⁵⁶, en parte por las complicaciones del procedimiento en sí mismo y probablemente por la implicación de otros factores relacionados con el sistema inmunológico o de defensa dañado, que permitiría el paso de bacterias y endotoxinas a la circulación sistémica a pesar de la restitución del flujo biliar.

II. 1. Disfunción de la barrera mucosa intestinal en la ictericia obstructiva experimental

Es importante el conocimiento de cuál es el origen las bacterias y endotoxinas que pueden desencadenar la infección sistémica en los pacientes con ictericia obstructiva. En modelos experimentales, la ligadura del conducto biliar incrementa la translocación de bacterias intestinales hacia otros tejidos normalmente estériles, fenómeno que ya es evidente a los 7 días de la ligadura en ratas^{44, 46}.

Esta circunstancia se ha comprobado mediante el cultivo de muestras procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo de roedores con ligadura de la vía biliar. En los medios de cultivo se aislaron fundamentalmente *Escherichia coli*, *Proteus* y *Staphylococcus species*. También se encontró asociación entre la incidencia de translocación y el sobrecrecimiento de bacilos entéricos gramnegativos en el ciego de estos animales. Sin

embargo, los cultivos de muestras procedentes de la bilis y de la cavidad peritoneal resultaron estériles, disminuyendo la probabilidad de contaminación bacteriana durante el procedimiento quirúrgico como causa de la infección en la ictericia obstructiva.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la infección bacteriana en la obstrucción biliar puede originarse en el tracto gastrointestinal, sin que existan otros focos de infección.

A su vez, el estudio del fenómeno de la translocación proporciona un método de valoración indirecto de la permeabilidad intestinal y de la integridad funcional de la barrera mucosa. En un modelo experimental de cirrosis en ratas Palma *et col* observaron in vivo bajo microscopio con fluorescencia la translocación de *E.coli* dentro de la mucosa y muscularis intestinal⁵⁷. Parks *et col*⁴⁴ estudiaron simultáneamente en un modelo de ictericia obstructiva experimental en ratas y en pacientes con obstrucción biliar, las alteraciones en la permeabilidad intestinal mediante la administración de polietilenglicol en los animales, y lactulosa y manitol en los pacientes. Posteriormente cuantificaron su eliminación en orina. Los pacientes, comparados con un grupo de voluntarios sanos, mostraron un índice de permeabilidad intestinal significativamente mayor que el grupo control; este aumento era más marcado a las 24 horas de la restauración del flujo biliar si se realizaba mediante cirugía, frente a la descompresión biliar no quirúrgica.

Esta diferencia puede advertirnos del reto adicional que puede suponer para la capacidad funcional de la barrera mucosa, la exposición a las endotoxinas en el momento de la laparotomía. De igual modo, se ha observado que existe un índice significativamente mayor de complicaciones infecciosas en pacientes que tienen translocación bacteriana en el momento de someterse a una intervención con respecto a aquellos que no la tienen⁵⁸.

Los índices de permeabilidad intestinal se normalizaron después de 7 días tras la cirugía. La restitución del flujo biliar mediante drenaje biliar interno produjo una recuperación paulatina de estos valores, que se normalizaron a los 28 días del mismo.

En el modelo experimental, las ratas después de 7 días de obstrucción biliar presentaban un incremento significativamente mayor de translocación bacteriana y permeabilidad intestinal, con respecto a los animales con operación simulada.

Si bien en otros estudios se han obtenido resultados similares, aún no conocemos exactamente cómo las bacterias escapan de la luz intestinal y el mecanismo patogénico que relaciona la obstrucción biliar con este proceso. Deitch^{59,60} defiende la conjunción de tres factores como desencadenantes del fenómeno: la ausencia de bilis en la luz intestinal favorece la disrupción de la microflora intestinal endógena, con el sobrecrecimiento de bacilos gramnegativos; las modificaciones histológicas que se producen a nivel de la mucosa intestinal, fundamentalmente edema subepitelial, disminución de la altura de la microvellosidades y del grosor total de la mucosa, que favorecen la translocación de las bacterias entéricas y finalmente, como tercer elemento, una respuesta inmunológica alterada, en la que las células de Kupffer del hígado permiten la fuga de endotoxinas y bacterias hacia la circulación sistémica.

Es difícil precisar qué factor soporta más peso en la patogenia de la infección en la ictericia obstructiva. En modelos experimentales ya fue documentado que tanto el drenaje biliar interno como el externo pueden disminuir la endotoxemia y la mortalidad relacionada con la misma⁶¹, aunque la derivación biliar es menos eficaz en este sentido y mejora si se asocia con la administración oral de sales biliares. Sin embargo, en estudios de pacientes con obstrucción biliar los efectos del drenaje biliar preoperatorio son más controvertidos como se discutirá más adelante. Tanto los niveles de endotoxinas y citoquinas son diferentes a los observados en modelos animales así como las variaciones tras la realización del drenaje

biliar interno⁶². También en estudios con pacientes se ha documentado que el drenaje biliar puede tener un efecto transitorio y diferente sobre los niveles de endotoxinas y citoquinas según la obstrucción biliar tenga un origen benigno o maligno⁶³.

Por otro lado, aunque la vena porta es considerada el principal sistema de drenaje de endotoxinas y bacterias procedentes del intestino, los vasos linfáticos podrían funcionar como ruta alternativa obviando el paso a través del hígado.

En trabajos más recientes, se ha prestado especial interés en el estudio del papel que al mismo tiempo ejercen las citoquinas secretadas por las células de Kupffer y otros macrófagos sobre las lesiones de la mucosa intestinal en situaciones de endotoxemia. Podrían actuar mediante la interacción con los microorganismos de la luz intestinal; el TNF- α es capaz de incrementar la capacidad invasiva de determinadas bacterias y, al mismo tiempo, su unión con receptores de membrana de la vertiente basolateral de las células epiteliales puede incrementar la permeabilidad de la barrera intestinal y facilitar la entrada de enterobacterias hacia los ganglios linfáticos mesentéricos.

Se ha detectado la presencia de IL-1, IL-6, TNF- α , factores del complemento y otras proteínas de fase aguda en la bilis. Se midieron mayores concentraciones de TNF- α e IL-6 en la bilis que en el plasma de ratas con endotoxemia, y este hallazgo se asociaba a lesiones más severas en la mucosa intestinal⁶⁴.

Es probable que estas citoquinas alcancen la luz intestinal por medio de la secreción biliar, más que desde la circulación sistémica. El bloqueo *in vivo* de las células de Kupffer con gadolinio produjo un descenso en la expresión de las mismas en la bilis y el plasma, y una disminución en las lesiones histológicas del epitelio intestinal.

II. 1. 1. Endotoxemia en la ictericia obstructiva

Las endotoxinas, lipopolisacárido (LPS) constituyente de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas, han sido ampliamente estudiadas en diferentes situaciones clínicas, y particularmente en el cuadro de sepsis.

Entre un 50 y hasta un 70 por 100 de los pacientes con ictericia obstructiva, presentan endotoxemia portal y sistémica. En general, el porcentaje de endotoxemia portal suele ser superior al de endotoxemia sistémica, sugiriendo que las endotoxinas deben originarse del tracto gastrointestinal. Se considera la ausencia de sales biliares como el factor iniciador de este fenómeno; tanto la obstrucción biliar como la derivación extradigestiva de la bilis provocan endotoxemia. Del mismo modo, la administración de ácidos biliares o la restitución del flujo biliar mediante técnicas de drenaje biliar interno reducen la absorción de endotoxinas⁶⁵.

En la endotoxemia sistémica en cambio, el mecanismo patogénico se ha relacionado con la disminución de la capacidad de aclaramiento de las células del SFM del hígado provocada por la obstrucción biliar, permitiendo que las endotoxinas portales alcancen la circulación sistémica.

El grado de endotoxemia se ha relacionado con los niveles de bilirrubina y se considera un factor predictor de morbimortalidad tras cirugía en estos pacientes⁶⁶. Sin embargo, su cuantificación se ha visto dificultada por dos circunstancias: las endotoxinas pueden ser liberadas de manera intermitente y una vez que alcanzan el torrente sanguíneo son rápidamente inactivadas, por lo que en determinaciones aisladas pueden encontrarse en concentraciones muy bajas incluso en situación de shock séptico. La determinación de

anticuerpos endógenos frente a endotoxinas podría reflejar con mayor precisión el grado de exposición a las mismas.

En pacientes sin ictericia o sepsis no se produce endotoxemia. No obstante, la absorción de pequeñas cantidades de endotoxinas a través de la mucosa intestinal normal puede ser un fenómeno habitual ⁷, y son aclaradas por las células de Kupffer.

En el contexto de la obstrucción biliar, la endotoxemia potencia el fenómeno de la translocación bacteriana, probablemente como promotor de una respuesta inflamatoria sistémica al inducir la liberación de citoquinas vasoactivas y proinflamatorias por las células del SFM, que conducen a alteraciones en la microcirculación intestinal, provocando hipoperfusión y aumento de la permeabilidad intestinal.

II. 1. 2. Translocación bacteriana en la ictericia obstructiva

La migración de bacilos entéricos viables a través de la barrera mucosa intestinal hacia ganglios linfáticos mesentéricos y órganos y tejidos distantes, ha sido considerado como impulsor de la respuesta inflamatoria sistémica en una variedad de situaciones clínicas entre las que se encuentra la ictericia obstructiva.

Como comentamos anteriormente, en modelos experimentales con roedores la ligadura de la vía biliar se asocia al fenómeno de translocación bacteriana hacia ganglios

linfáticos mesentéricos, aproximadamente en un tercio de los animales tras 7 días de ligadura, superando el 40 por 100 a las dos semanas.

La pérdida de la bilis de la luz intestinal más que la propia obstrucción biliar en sí, parece ser uno de los factores iniciadores de la translocación^{46, 67}, que también sucede cuando se deriva el flujo biliar fuera de su recorrido por el tracto intestinal; y al igual que ocurre con el fenómeno de endotoxemia, la reposición oral de las sales biliares o la restitución del flujo biliar mediante técnicas de drenaje interno, pueden disminuir la translocación de bacterias.

Aunque el mecanismo exacto no se conoce, se ha atribuido a la acción detergente de las sales biliares, que compromete la integridad de la pared celular de las bacterias intestinales lo que conduce de una parte, a la inhibición de la proliferación bacteriana, y de otra, a la transformación de las endotoxinas en agregados micelares que no pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal.

En modelos animales, tras un período corto de obstrucción biliar de una semana la ausencia intraluminal de sales biliares conlleva el sobrecrecimiento de bacterias Gramnegativas aerobias y un alta incidencia de translocación fundamentalmente en ganglios linfáticos mesentéricos; la limitación de la translocación en esta localización y los bajos niveles de endotoxinas y anticuerpos frente a ellas puede reflejar una función normal del sistema fagocítico mononuclear en estadios iniciales de obstrucción biliar.

Cuando la duración de la obstrucción biliar se prolonga en el tiempo, la translocación se detecta en tejidos más distantes como los pulmones, donde los macrófagos alveolares tienen menos capacidad bactericida con respecto a las células de Kupffer, lo que permite la

supervivencia de las bacterias y la perpetuación de la respuesta inflamatoria a nivel pulmonar.

A nivel intestinal, aunque en períodos prolongados de obstrucción biliar la microflora se normalice, el deterioro de la función del SFM, especialmente de las células de Kupffer, para el aclaramiento de endotoxinas y otras toxinas junto a los efectos tóxicos de las altas concentraciones de sales biliares, mantendrán la respuesta inflamatoria local así como los fenómenos de endotoxemia y translocación bacteriana hacia órganos distantes ⁴³.

II. 2. Alteraciones de la inmunidad en la ictericia obstructiva experimental

Las alteraciones en la capacidad de respuesta del sistema inmunitario se relacionan cada vez con mayor fuerza con la mayoría de las complicaciones, tanto infecciosas como no infecciosas, observadas en la ictericia obstructiva. Los fenómenos que hemos revisado de endotoxemia y translocación bacteriana probablemente participen en el inicio y potencien dichas alteraciones.

Gracias al desarrollo de modelos experimentales de obstrucción biliar, cada día conocemos mejor el compromiso funcional de los diferentes componentes celulares de la respuesta inmune.

Los primeros trabajos se centraron en la capacidad de aclaramiento del Sistema Fagocítico Mononuclear del hígado, y en general, se observó un descenso en la capacidad fagocítica de las células de Kupffer. Si bien en estadios precoces de la obstrucción biliar (en general, en los primeros 7 días tras la ligadura del conducto biliar en modelos experimentales con roedores) se ha comprobado un incremento en el número global de las células de Kupffer, sin embargo, la mayoría de estas células se encuentran en un estado inactivo¹⁷.

Hoy sabemos que también existe una afectación de la inmunidad celular inespecífica extrahepática y de las células efectoras de la respuesta inmune específica.

II. 2. 1. Alteraciones de la inmunidad local

El hígado alberga más del 80 por 100 de las células del Sistema Fagocítico Mononuclear, primeras responsables del aclaramiento de antígenos celulares, endotoxinas y microorganismos procedentes del tubo digestivo, lo que le convierte en el órgano más importante cuantitativamente del SFM. Esta capacidad de aclaramiento se encuentra

disminuida en situaciones clínicas como la ictericia obstructiva, el trauma, la cirugía y la sepsis. En la ictericia obstructiva, se produce una disminución de la capacidad fagocítica de las células de Kupffer, y ésta se relaciona inversamente con los niveles de endotoxinas y de bilirrubina en sangre ^{5, 68} y con la duración de la obstrucción ⁶⁹.

En modelos experimentales de obstrucción biliar con ratas, la endotoxemia portal promueve la activación y el aumento de la población global de macrófagos hepáticos; no obstante, si la obstrucción se mantiene en el tiempo, se produce una disminución en la capacidad de aclaramiento de partículas por las células de Kupffer, sin que exista una disminución del flujo sanguíneo del hígado.

Ding *et col* ⁶⁹ comunicaron que tras la administración intravenosa o intraperitoneal de bacterias *E. coli* a ratas con ictericia, se producía una disminución en la velocidad de aclaramiento de las mismas, y observaron que las bacterias se concentraban en el hígado y en otros órganos como el bazo, riñones y pulmones donde los macrófagos locales tratan de compensar la disfunción de las células de Kupffer resultando menos eficaces, por lo que podrían actuar como un reservorio de bacterias que favorecería la perpetuación de la sepsis y la disfunción de dichos órganos.

Otros autores defienden que la obstrucción biliar, por sí misma, puede producir una lesión directa sobre las células hepáticas y alterar sus funciones, independientemente de los fenómenos de translocación y endotoxemia ⁷⁰. La obstrucción del tracto biliar conlleva un incremento de la presión en los canalículos biliares, hiperbilirrubinemia y una elevación de los niveles séricos de ácidos biliares, factores con potenciales efectos tóxicos e inmunomoduladores sobre las células de Kupffer.

Además de su actividad fagocitaria, los macrófagos ejercen un papel protagonista en la regulación de la respuesta inmunológica, como células presentadoras de antígeno y mediante la secreción de diferentes citoquinas proinflamatorias y reguladoras de la respuesta inmune.

En la obstrucción biliar, se ha descrito un incremento de la secreción, tanto espontánea como mediada por diferentes estímulos, de citoquinas proinflamatorias por las células de Kupffer como el TNF- α , la IL-1 y IL-6, y de citoquinas con acción antiinflamatoria como la IL-10. Sin embargo, este estado “proinflamatorio” no implica mayor eficacia en la lucha antibacteriana. El mantenimiento de la homeostasis durante la infección bacteriana implica un delicado equilibrio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias⁷¹.

Junto a las células de Kupffer, el hígado contiene una importante población de células NK que representan la primera línea de defensa frente al implante de células metastásicas en el hígado y pueden inhibir el crecimiento local de dichas metástasis^{35, 36}.

En la ictericia, probablemente también se encuentre deprimida la función antitumoral de las células NK. Hirazawa *et col*³⁵ evaluaron la influencia de la obstrucción biliar sobre las funciones de las células no parenquimatosas del hígado, mediante un modelo animal en el que midieron el crecimiento de una línea de células tumorales tras su inoculación en la vena porta; posteriormente valoraron la eficacia del drenaje biliar interno previo al implante. Encontraron que la obstrucción biliar favorecía el crecimiento de las metástasis y, del mismo modo, el drenaje biliar disminuía este efecto cuando se realizó dos semanas antes de la inoculación de las células tumorales en los animales con ictericia.

II. 2. 2. Alteraciones en la respuesta inmune sistémica.

Como mencionamos anteriormente, en estudios clínicos se ha observado que los pacientes con obstrucción biliar presentan una mayor incidencia de complicaciones infecciosas tras la cirugía o después de procedimientos diagnósticos invasivos⁵². Esta mayor susceptibilidad a la infección se ha relacionado con la alteración de la función inmune.

Aunque no conocemos exactamente cuál es el patrón inmunológico de los pacientes con ictericia, se ha descrito un deterioro en la respuesta inmune mediada por células en enfermos con carcinoma de páncreas, y también en otras formas de enfermedad hepática que se acompañan de cierto grado de colestasis.

Los modelos experimentales han estudiado ampliamente el funcionamiento de las células del SFM del hígado en el contexto de la obstrucción biliar. Posteriormente se ha producido un interés cada vez más creciente en conocer la afectación funcional de otras células polimorfonucleares y de los linfocitos T.

II. 2. 2. a. Respuesta inmune sistémica inespecífica

La actividad de las células fagocitarias extrahepáticas participa activamente en el control y eliminación de las bacterias patógenas. El papel de los neutrófilos en la ictericia obstructiva es motivo de controversia con resultados diferentes según distintos estudios en modelos experimentales, con incrementos o descensos en el recuento de neutrófilos aunque parece que existe una sobreestimulación sobre la capacidad de respuesta metabólica, en la producción de citoquinas y en la capacidad de fagocitosis⁷²⁻⁷⁴ y dichos efectos varían según la duración de la obstrucción.

Junto a las células del SFM, los granulocitos neutrófilos son las principales células fagocitarias del organismo. Juegan un papel crucial en la defensa frente a las bacterias. En la ictericia obstructiva, se pueden ver afectadas diferentes funciones como la adhesión, la emigración y quimiotaxis, y la fagocitosis y degradación intracelular de las partículas ingeridas.

Si bien son las primeras células en acudir al foco de la lesión, en la obstrucción biliar su sobreestimulación y presencia en exceso en los tejidos puede provocar toxicidad sobre los mismos mediante la acción de sus enzimas citolíticas y por medio de metabolitos tóxicos derivados del oxígeno.

En modelos experimentales de obstrucción biliar se ha observado una hiperreactividad de estas células con un incremento de la quimiotaxis y de la generación de anión superóxido, favoreciendo el desarrollo de la respuesta inflamatoria sistémica y del fracaso multiorgánico descrito en la ictericia obstructiva⁷⁵.

II. 2. 2. b. Respuesta inmune sistémica específica

Ya en 1980, Pinto y Kaplun⁷⁶ comunicaron una depresión en la capacidad funcional de los linfocitos T en modelos de ligadura de la vía biliar en ratones, aunque no encontraron entonces que se acompañara de una disminución en el número total de células T.

En trabajos posteriores con modelos experimentales de obstrucción biliar en ratas, diferentes autores han estudiado la capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos T, mediante la administración de mitógenos celulares como la fitohemaglutinina. Estos trabajos

mostraron que se produce una depresión en la respuesta proliferativa de las células T, y ésta se correlaciona con la duración de la ictericia³⁶.

La inmunosupresión se instaure de forma progresiva cuando la obstrucción biliar se mantiene en el tiempo⁷⁷; en estadios precoces no se observa la alteración funcional en determinadas poblaciones de linfocitos T a pesar de que exista una evidencia en los parámetros bioquímicos de disfunción hepática. Este patrón de inmunosupresión que requiere tiempo para establecerse, es similar a otros resultados que se han comunicado con la actividad de las células de Kupffer.

La causa exacta de esta depresión funcional de los linfocitos T se desconoce, probablemente sea multifactorial e implique otros déficits celulares y la presencia de algún factor inhibidor en el plasma de los animales con ictericia. Entre otros, se ha descrito que la bilirrubina, los ácidos biliares o las endotoxinas pueden inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*.

En la actualidad las células T se clasifican en dos tipos: células T intratímicas (derivadas del timo y se distribuyen en casi todos los órganos) y células T extratímicas, que se localizan específicamente en los sinusoides hepáticos y dentro del epitelio intestinal y que pueden desempeñar un importante papel inmunológico supresor o inhibidor del desarrollo de las células T intratímicas así como en la pérdida de función de la barrera intestinal en pacientes con ictericia, fenómeno que podría iniciarse por la ausencia de bilis en la luz intestinal; aunque también hay trabajos que han observado una inhibición de la función y de la proporción de linfocitos por efecto de las sales biliares⁷⁸.

Thompson *et al*⁷⁷ también observaron una recuperación en la capacidad funcional de los linfocitos T a los 14 días de realizar un drenaje biliar interno a ratas con ligadura de la vía

biliar; no obstante, la normalización de la inmunocompetencia se produjo a los 28 días del drenaje, aunque los parámetros de función hepática ya estaban normales a las dos semanas. El drenaje biliar externo no resultó tan eficaz como el interno, sugiriendo la importancia de la recuperación de la bilis en la luz intestinal para que se desarrolle una respuesta inmune normal.

Asimismo, en modelos con ratas libres de gérmenes ⁷⁹ que solo contienen cantidades inapreciables de endotoxinas en la luz intestinal, la respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos no se vio afectada.

Este hallazgo sugiere que la inmunosupresión celular en la ictericia obstructiva puede estar relacionada con la endotoxemia. En el estudio anterior, la administración subcutánea de endotoxinas resultó en una supresión de la inmunidad celular similar a la encontrada en ratas convencionales.

Además de las endotoxinas, pueden existir otros factores implicados en la inmunosupresión en la obstrucción biliar. Las deficiencias nutricionales observadas en los pacientes con ictericia han motivado trabajos en los que se emplearon suplementos nutricionales con L-arginina, que parcialmente consiguieron mejorar la inmunosupresión, independientemente de la exposición a endotoxinas ⁸⁰.

Pero al mismo tiempo de la existencia de un estado de inmunosupresión en la ictericia obstructiva cuyos mecanismos fisiopatogénicos aún no están completamente definidos, el hígado es considerado un órgano con propiedades inmunológicas paradójicas ⁸¹; se asocia con la inducción de inmunotolerancia, y al mismo tiempo conserva la capacidad de mantener una respuesta eficaz frente a los patógenos procedentes del intestino que continuamente alcanzan los sinusoides hepáticos a través de la circulación portal.

Los factores que determinan este balance no están claros y se han propuesto varios mecanismos para explicar la inmunotolerancia hepática. En general los linfocitos requieren ser activados en tejidos linfoides periféricos a través de las células presentadoras de antígeno, antes de migrar a otros órganos e interactuar con las células parenquimatosas. Parece que el hígado podría ser una excepción a este modelo y los linfocitos T CD8⁺ podrían ser simultáneamente activados en el hígado y esta vía resultaría menos eficaz inmunológicamente conduciendo a estos linfocitos a presentar menor capacidad citotóxica y una supervivencia más reducida con respecto a los linfocitos T CD8⁺ activados en nódulos linfáticos⁸².

Dentro del hígado hay cada vez mayor evidencia de que los hepatocitos actuarían como células presentadoras de antígeno expresando niveles elevados de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I así como moléculas de adhesión intracelular tipo 1 (ICAM-1) y establecerían interacciones directas con los linfocitos a través de fenestraciones del endotelio en los sinusoides hepáticos⁸³.

II. 3. Papel del TNF- α

La respuesta inflamatoria a la endotoxemia es uno de los factores etiológicos que más se ha relacionado con las complicaciones observadas en pacientes con ictericia obstructiva.

En la última década, se ha dedicado un especial interés al estudio de las diferentes citoquinas que actúan como mediadoras de los efectos biológicos de las endotoxinas y modulan la cascada inflamatoria; la activación incontrolada de esta respuesta inflamatoria se ha relacionado con la insuficiencia renal y las complicaciones infecciosas observadas en pacientes con ictericia que son intervenidos, y puede llegar a originar las alteraciones propias del síndrome de disfunción multiorgánica.

Hasta la fecha, se han caracterizado numerosas citoquinas, pero de especial interés en la patogenia del síndrome de disfunción en la obstrucción biliar se han considerado el TNF- α , la IL-6 y más recientemente los receptores solubles del TNF- α (sTNFr).

El TNF- α protagoniza un papel central como mediador en diferentes procesos inflamatorios. Originariamente se relacionó con situaciones concretas como la habilidad de inducir necrosis hemorrágica en la evolución de determinados tumores y de inducir caquexia en situaciones de infección crónica. Actualmente se reconoce su papel como mediador en la cascada inflamatoria y se reconoce su participación en muchos aspectos del daño tisular que sigue a los procesos de respuesta inflamatoria tanto aguda como crónica⁸⁴.

En modelos animales de ictericia obstructiva, se ha constatado un incremento en los niveles circulantes de TNF- α , y parece que la principal fuente de este TNF- α endógeno se debe a la hiperreactividad de las células de Kupffer del hígado⁸⁵; la respuesta de macrófagos de otros órganos como pulmones y riñones parece que no alcanza la misma magnitud. No obstante, este incremento no implica necesariamente que se encuentren en un estado

biológicamente activo, y deben existir otros mecanismos que medien en la respuesta inflamatoria ya que el bloqueo del TNF- α no corrige todas las secuelas de la activación del proceso inflamatorio ⁸⁶.

También se ha documentado una disminución en los niveles de TNF- α a medida que la obstrucción biliar persiste más allá de las dos semanas y al mismo tiempo, parece que la exposición continua a endotoxinas y la translocación bacteriana como sucede en la ictericia obstructiva, se acompaña de una tolerancia para la producción de TNF- α por las células de Kupffer ^{87, 88}.

Los receptores del TNF- α constituirían otro mecanismo de control frente a los efectos nocivos de una respuesta inflamatoria continuada. El TNF- α es sintetizado como una proteína transmembrana no glicosilada de 25 kD. Tras una proteólisis se produce un fragmento de 17 kD que es la forma circulante. Para ejercer su efecto, el TNF- α debe unirse a su receptor específico que está en todas las células y lo hace con una afinidad relativamente baja para una citoquina. Los dos receptores solubles del TNF- α (sTNFr 55-kD y 75-kD) se localizan enclavados en el dominio extracelular de la membrana de las células diana de esta citoquina y ambos son liberados como moléculas solubles capaces de unirse al TNF- α .

Las actividades biológicas del TNF- α estarían mediadas por estos dos receptores, que son estructuralmente parecidos pero funcionalmente distintos: de modelos experimentales empleando anticuerpos específicos o bien mediante ratones genéticamente deficientes de uno u otro receptor se depende que muchos de los efectos del TNF- α incluyendo su citotoxicidad son producidos mediante su unión al receptor p55. Aunque el papel del receptor p75 está menos definido, entre sus efectos se incluye la inducción de la proliferación de los linfocitos T intratímicos, la necrosis cutánea mediada por TNF- α y la apoptosis de linfocitos T maduros activados; a su vez, los receptores p75 parece que modularían la respuesta dependiente de los p55 ⁸⁴.

Paradójicamente, al mismo tiempo se considera que ambos receptores pueden funcionar tanto como agonistas el TNF- α como eficaces antagonistas; en la ictericia obstructiva, la endotoxemia favorece que los sTNFr se desprendan de la célula y se postula que mediante este mecanismo el TNF- α unido a los receptores solubles no puede ejercer sus efectos sobre sus células diana; así la producción de los sTNFr durante la sepsis constituiría un mecanismo natural para atenuar la acción del TNF- α ⁸⁹.

Tanto en humanos como en modelos animales, parece que los riñones son los principales reguladores del aclaramiento del complejo TNF-sTNFr. En ratones con ictericia, Bemelmans *et col*²⁷ observaron que los niveles de ambos receptores se encuentran significativamente aumentados, en contraste con el TNF- α solo, y estos niveles se correlacionaban con la mortalidad por isquemia renal.

La disfunción renal y el síndrome de disfunción multiorgánica continúan siendo dos complicaciones frecuentes en el período postoperatorio de pacientes con obstrucción biliar, y este riesgo se relaciona con el grado de ictericia. Tanto el TNF- α como la IL-6 podrían favorecer la hiperbilirrubinemia en situaciones de endotoxemia al afectar el flujo biliar a través de los canalículos biliares, mediante la alteración de los mecanismos de transporte celulares de las sales biliares y al incrementar la permeabilidad de las uniones intercelulares entre hepatocitos a nivel de los sinusoides. Por estos mecanismos la administración de TNF- α recombinante podría causar hiperbilirrubinemia y la administración de anticuerpos anti-TNF- α podría bloquear dicho efecto y disminuir la hiperbilirrubinemia⁹⁰.

III. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO

III. 1. Drenaje biliar

Como se ha mencionado anteriormente, las complicaciones infecciosas continúan siendo una de las causas más frecuentes de morbimortalidad en pacientes con ictericia obstructiva cuando son sometidos a intervenciones o a procedimientos invasivos, y este riesgo aumenta cuanto más intensa es la ictericia y cuanto mayor es el tiempo de evolución de la obstrucción biliar.

La hiperbilirrubinemia en la ictericia obstructiva se asocia a un deterioro de las funciones de defensa inmunológica del hígado y de la capacidad de aclaración de endotoxinas. Al mismo tiempo, la obstrucción biliar determina la interrupción de la circulación enterohepática de las sales biliares y la disrupción de la barrera mucosa intestinal favoreciendo el sobrecrecimiento y la translocación de bacterias hacia la circulación portal y sistémica.

Cabría esperar que el retorno del flujo biliar mediante técnicas de drenaje biliar interno conllevaría la restitución progresiva de todas estas funciones^{63,75}; sin embargo, este esperable beneficio fisiológico demostrado en modelos experimentales, no se traduce siempre en un beneficio en la práctica clínica, existiendo controversias sobre la idoneidad del drenaje biliar preoperatorio de rutina en los pacientes con ictericia obstructiva.

Si bien en los modelos animales el drenaje biliar mejora la función hepática y el estado nutricional, disminuye la endotoxemia y la liberación de citoquinas y mejora la inmunidad celular. Todo ello se traduce en una disminución de las complicaciones sépticas y de la mortalidad tras la cirugía. Pero también en estos modelos experimentales y en los

ensayos clínicos las técnicas de drenaje no están exentas de sus propias complicaciones: la inserción de prótesis en la vía biliar puede condicionar una contaminación bacteriana de la bilis con el riesgo asociado de colangitis y también determina una inflamación crónica de la pared del conducto biliar que puede aumentar el riesgo de fugas tras la cirugía. Además esta inflamación puede perdurar meses después tras la retirada de la prótesis^{91, 92}.

En ensayos clínicos con pacientes con ictericia obstructiva el drenaje biliar preoperatorio se ha asociado con una mayor tasa de complicaciones infecciosas y de dehiscencias de anastomosis y probablemente la contaminación de la bilis y la inflamación de la pared de la vía biliar sean los responsables de estas complicaciones. Por ello la tendencia actual es no recomendar el drenaje biliar preoperatorio de forma sistemática, sino realizar cirugía precoz en aquellos pacientes potencialmente resecables y reservar el drenaje biliar para aquellos pacientes en los que esta cirugía no es posible, que van a recibir neoadyuvancia, en situación de colangitis o que vayan a precisar hepatectomías extensas^{56, 93-95}.

Con respecto a las ventajas del drenaje biliar interno frente al externo complementado o no con la administración oral de ácidos biliares también hay discrepancias en cuanto a los resultados de los distintos trabajos. Si bien el drenaje biliar interno demostró ser más eficaz en términos de reducción de la endotoxemia y la mortalidad, otros autores demostraron mayor eficacia, a corto plazo, en la recuperación de la inmunidad celular y menos complicaciones tras la cirugía con el drenaje biliar externo así como un descenso más rápido de las cifras de bilirrubina⁹⁶.

Otras ventajas del drenaje biliar externo percutáneo frente al interno serían aquellas relacionadas con la técnica en sí misma: aunque quizás menos confortable para los pacientes, el drenaje externo presenta menos obstrucciones del catéter y menos riesgo de presentar colangitis ascendente. Además, las técnicas de drenaje biliar interno provocarían

mayor inflamación local a nivel de la vía biliar como se ha comentado anteriormente y esto se podría relacionar con mayores complicaciones infecciosas postoperatorias.

No obstante hay que mencionar de nuevo el beneficio que aporta el drenaje biliar interno al restituir el flujo biliar al intestino, disminuyendo la translocación bacteriana y la endotoxemia y permitiendo la recuperación de la barrera mucosa intestinal y favoreciendo la recuperación de la inmunidad celular tanto a nivel local como sistémico ⁹⁷.

Sin embargo, los modelos experimentales muestran un beneficio evidente del drenaje biliar interno frente al externo asociado o no a suplementos orales de ácidos biliares, tanto en términos de regeneración hepática como en la mejoría del estado nutricional y de preservación de la inmunidad celular ⁹⁸⁻¹⁰¹ y en la recuperación funcional de las células de Kupffer y favoreciendo la normalización del estado inflamatorio asociado a la endotoxemia y a la hipersecreción de las citoquinas como el TNF- α y la IL-6 ¹⁰².

Otro aspecto de interés sería determinar la duración idónea del drenaje antes de la cirugía que permita la recuperación adecuada de las distintas disfunciones hepáticas y de defensa inmunitaria, con recomendaciones de un mínimo de cuatro a seis semanas o incluso mayores, o en trabajos más recientes de al menos tres semanas para que comience la recuperación de la función de las células de Kupffer ^{5, 103}.

III. 2. Anticuerpos anti TNF-alfa

La ictericia obstructiva se asocia a un estado proinflamatorio como resultado de la endotoxemia portal y sistémica, junto a una disminución de la capacidad de aclaramiento por las células de Kupffer de estas sustancias tóxicas así como un deterioro de la capacidad de lisis intracelular de las bacterias que fagocitan.

La exposición a la endotoxemia y a la translocación de bacterias conduce a una activación permanente de la cascada inflamatoria mediada por citoquinas proinflamatorias segregadas por las células de Kupffer y otras poblaciones celulares hepáticas. Entre esas citoquinas, el TNF- α parece ocupar un papel relevante como se explicó anteriormente.

Aunque a pesar de esta perspectiva que nos aportan los modelos experimentales, a menudo en pacientes con obstrucción biliar, la concentración de mediadores inflamatorios como el TNF- α o sus receptores no siempre se detecta elevada.

El TNF- α es principalmente segregado por los macrófagos, pero también por otra variedad de células como las NK, los linfocitos T, células musculares, fibroblastos y otras^{104, 105}. Los efectos dependerán de la cantidad producida. Su liberación sucede en respuesta a estímulos inflamatorios, a otras citoquinas y a componentes de las bacterias como los lipopolisacáridos. Los efectos biológicos de la unión del TNF- α a sus receptores también dependerán del tipo de receptor activado, y así mismo del tipo de receptor dependerá que la célula diana activada pase a un estado de apoptosis o no, constituyendo un sistema de autoregulación.

Se han desarrollado una gran variedad de reactivos para intentar neutralizar la actividad del TNF- α . Los receptores solubles del TNF- α serían un mecanismo natural para atenuar los efectos de TNF como se ha explicado ⁸⁹; Bemelmans et col ²⁷ determinaron concentraciones elevadas de TNF- α y sTNFr en ratones con ictericia obstructiva cuando fueron sometidos a trauma quirúrgico, y encontraron mayor correlación entre la elevación de los sTNFr y la mortalidad asociada a la agresión quirúrgica que con el propio TNF- α . El tratamiento previo a la cirugía con lactulosa redujo asimismo de manera significativa las concentraciones postoperatorias de sTNFr-p75 y la mortalidad sin reducir los niveles de TNF- α , mientras que los anticuerpos anti-TNF- α resultaron ineficaces. Así, los niveles de sTNFr más que los de TNF- α mostraron mejor correlación con la mortalidad asociada a la cirugía en situación de obstrucción biliar.

La aplicación de las terapias anti-TNF en otros escenarios clínicos como la enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide ha sufrido un desarrollo exponencial en la última década ^{106, 107}, frente a su empleo en otras situaciones clínicas como la ictericia obstructiva ⁸⁶, la sepsis severa ¹⁰⁸, la hepatitis alcohólica ¹⁰⁹ o el TNF- α como terapia anticancerígena ¹¹⁰.

Desde que se identificara en los años ochenta el TNF- α como una citoquina con un papel protagonista como mediador proinflamatorio, se ha producido el desarrollo de una gran variedad de anticuerpos monoclonales, todos con la capacidad de reaccionar y neutralizar la molécula soluble de TNF- α in vitro, pero con diferencias estructurales en sus moléculas, lo que puede ser el condicionante de los distintos efectos terapéuticos, de sus diferentes efectos adversos y de la pérdida de eficacia ^{111, 112}.

La administración de anticuerpos anti-TNF- α en un modelo de ratas con ictericia obstructiva sometidas a trauma quirúrgico, produjo una disminución significativa de los niveles séricos de TNF aunque no mejoró la mortalidad relacionada con la cirugía ¹⁹.

Por otro lado, la administración de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α en ratas a los tres días de la ligadura del conducto biliar y durante cinco días consecutivos consiguió reducir de manera significativa los parámetros de lesión tisular miocárdica con respecto al grupo control ¹¹³.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Bases generales

La ictericia obstructiva experimental se caracteriza por un estado de deterioro progresivo de las distintas funciones del hígado, entre las que se encuentra su papel dentro del sistema inmunológico del organismo. Dentro de sus funciones defensivas destaca la capacidad de fagocitosis y aclaración por la población de células de Kupffer de sustancias tóxicas, bacterias y endotoxinas que proceden de la circulación portal y sistémica. Pero también se encuentra implicada la disfunción de las poblaciones linfocitarias residentes en el hígado.

Esta disfunción inmunológica se encuentra agravada en la ictericia obstructiva por la ausencia de sales biliares en la luz intestinal, con la alteración de la barrera mucosa, el sobrecrecimiento bacteriano y la translocación de bacterias que alcanzan el hígado, donde las células de Kupffer son incapaces de aclarar esta llegada permanente y aumentada de endotoxinas.

Al mismo tiempo, la activación permanente de las células de Kupffer genera la secreción de citoquinas proinflamatorias entre la que se encuentra el TNF- α , mediador de la cascada inflamatoria, cuya activación prolongada provocaría la liberación incontrolada de otras citoquinas, pudiendo desencadenarse las alteraciones metabólicas, hemodinámicas y patológicas propias del síndrome de disfunción multiorgánica.

Sobre estas bases nos planteamos las siguientes hipótesis:

Hipótesis específica

Asumiendo que en la ictericia obstructiva existe una activación de las células de Kupffer que genera la secreción de citoquinas proinflamatorias entre las que se encuentra el TNF- α , la aplicación de los anticuerpos anti-TNF- α en esta situación podría revertir la activación de la cascada inflamatoria que determina la secreción incontrolada de citoquinas mediada por el propio TNF- α .

OBJETIVOS

I. Objetivo principal

Este trabajo tiene como objetivo principal evaluar los efectos de la administración de anticuerpos anti-TNF- α sobre las alteraciones de la inmunidad celular observada en la ictericia obstructiva experimental.

II. Objetivos específicos

1. Evaluar los efectos observados en la ictericia obstructiva experimental sobre las subpoblaciones celulares que constituyen inmunidad celular específica.
2. Evaluar los efectos observados en la ictericia obstructiva experimental sobre la inmunidad celular inespecífica, determinando las subpoblaciones de Monocitos-Macrófagos, Granulocitos y Células NK, así como determinando la capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos.
3. Analizar el impacto de la administración de los anticuerpos anti-TNF- α en la ictericia obstructiva experimental sobre las mismas subpoblaciones celulares.
4. Comparar los potenciales efectos del anti-TNF- α con el drenaje biliar interno en la ictericia obstructiva experimental.

MATERIAL Y MÉTODO

I. Animales de experimentación

I. 1. Cuidado de los animales

Para el desarrollo de este estudio se han empleado ratas macho adultas raza Wistar, con peso comprendido entre 250 y 330 g, procedentes del animalario de la Unidad Experimental del Hospital Universitario Reina Sofía.

Los animales se colocaron en jaulas individuales y permanecieron en las mismas condiciones de iluminación (12 horas de luz/12 horas de oscuridad), temperatura (20-23°C) y con libre acceso al agua y a la alimentación (Piensos equilibrados Purina®, Barcelona, España). Estas condiciones se mantuvieron durante todo el tiempo de desarrollo del trabajo.

I. 2. Anestesia y preparación prequirúrgica

Para la realización de los procedimientos quirúrgicos y los sacrificios, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de Ketamina 60 mg/kg (Ketolar®) y Midazolam 4 mg/kg (Dormicum®), con jeringa y aguja de insulina. Después se procedió al rasurado del abdomen y la desinfección del mismo con povidona yodada.

Los procedimientos se llevaron a cabo sobre mesas termorreguladas con fuente de luz propia (Harward Aparattus, Kent, Reino Unido) (Figura 1).



Figura 1. Mesa de trabajo.

Se mantuvieron las normas de asepsia durante todas las intervenciones.

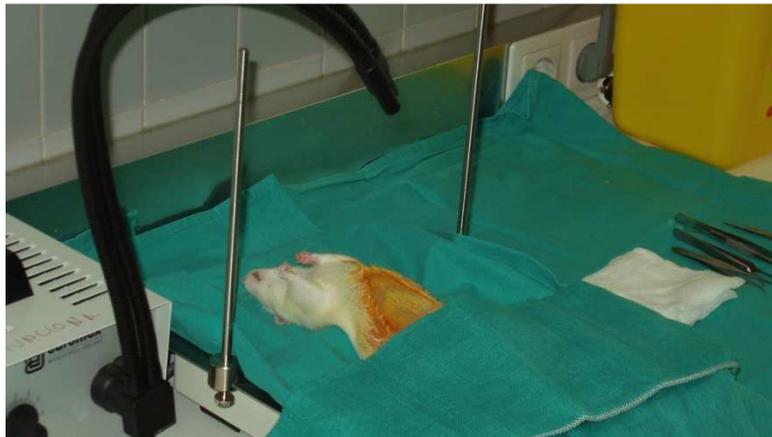


Figura 2. Campo y material quirúrgico.

II. Grupos experimentales

El trabajo se organizó en ciclos de 21 días. En el día 1 de cada ciclo se intervino un animal de cada grupo, y a los 14 y 21 días se realizaron las intervenciones correspondientes según el grupo al que perteneciera el animal.

Los ciclos se repitieron consecutivamente hasta conseguir 5 animales en cada grupo. Los grupos de trabajo fueron los siguientes (Figura 3):

II. 1. GRUPO 1: “Operación simulada-21 días”

El día 1 del estudio se realizó una laparotomía media y la disección y movilización del conducto biliar. El sacrificio y recogida de muestras se hizo a los 21 días.

II. 2. GRUPO 2: “Ictericia obstructiva-14 días”

El día 1 se llevó a cabo la ligadura del conducto biliar y el sacrificio y obtención de muestras a los 14 días.

II. 3. GRUPO 3: “Ictericia obstructiva-21 días”

En el día 1, ligadura del conducto biliar; a los 21 días, sacrificio y obtención de las muestras.

II. 4. GRUPO 4: “Ictericia obstructiva-drenaje biliar interno”

El día 1 se realizó la ligadura del conducto biliar. A los 14 días se realizó un drenaje biliar interno según una técnica propia que describiremos más adelante. El día 21, 7 días después del drenaje, se hizo el sacrificio y recogida de las muestras.

II. 5. GRUPO 5: “Ictericia obstructiva-antiTNF- α ”

El día 1 se procedió a la ligadura del conducto biliar. A los 14 días se administró una dosis única de anticuerpos frente al TNF- α , mediante inyección intramuscular. El día 21 se procedió al sacrificio y recogida de las muestras.

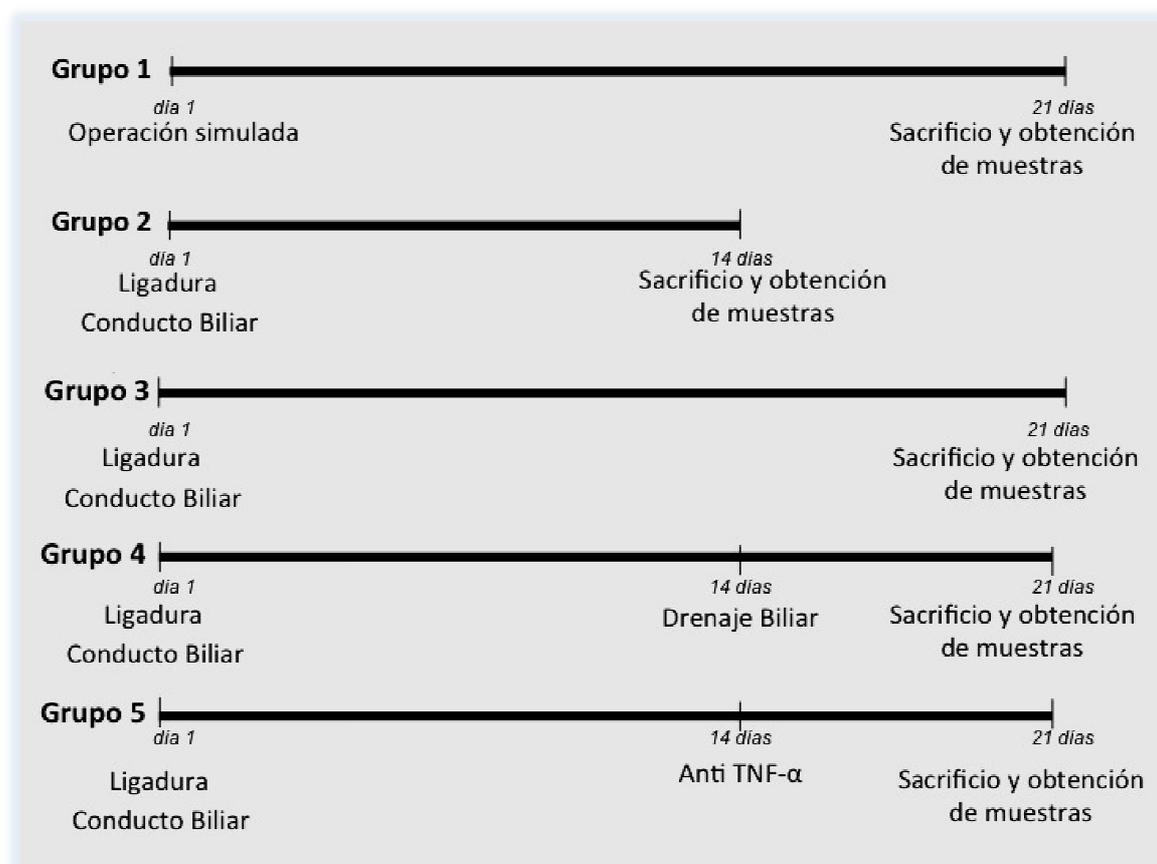


Figura 3. Grupos de trabajo.

III. Técnica quirúrgica

III. 1. Ligadura del conducto biliar

La vía de abordaje fue mediante incisión media desde xifoides al pubis.

La vía biliar extrahepática de la rata se caracteriza por la inexistencia de vesícula biliar. En sentido distal el colédoco es retroduodenal y por último intrapancreático, donde recibe el drenaje del páncreas exocrino antes de finalizar en el duodeno¹¹⁴. Las ratas poseen un duodeno móvil y mediante una tracción suave del mismo se expone la porción distal de los conductos hepáticos, que se unen en un largo y fino conducto biliar común.

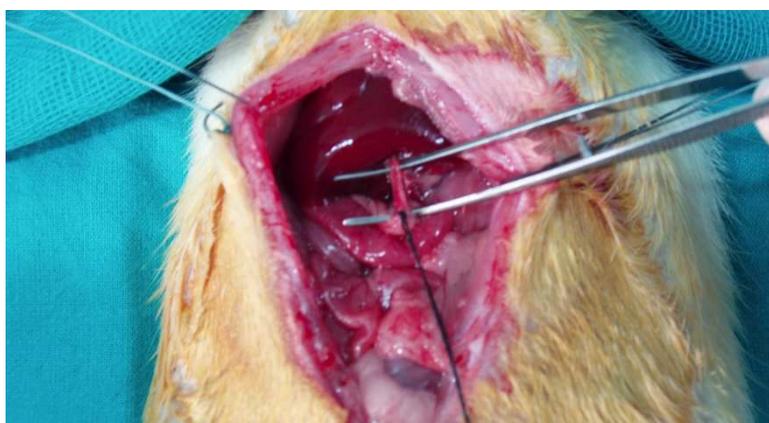


Figura 4. Disección y ligadura con seda del conducto biliar común.

En la mayoría de su recorrido el conducto biliar común discurre muy próximo al páncreas y es disecado y ligado justo por debajo de la unión de los conductos hepáticos, empleando doble ligadura de seda de 3/0, y después se secciona entre ligaduras¹¹⁵.

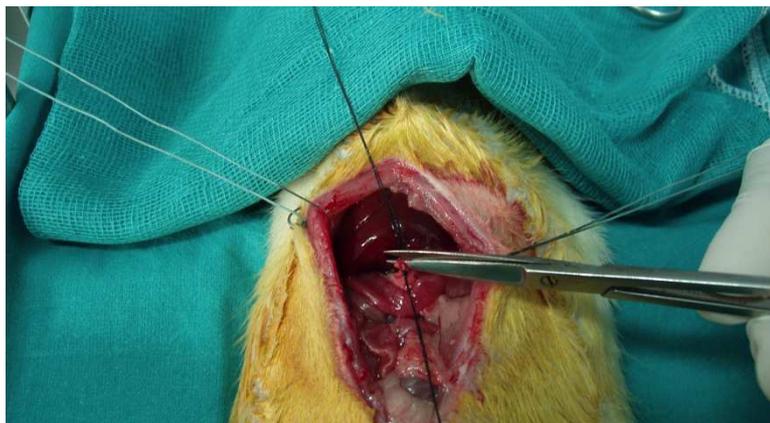


Figura 5. Sección entre ligaduras del conducto biliar común.

Al finalizar el procedimiento la cavidad abdominal se lava con 5 ml de suero fisiológico y el cierre de la pared se realiza en dos planos con suturas continuas 2/0 con Dexon (Braun Dexon, Barcelona, España) y Mersilk (Ethicon, Bruselas, Bélgica).

III. 2. Drenaje biliar interno

Del mismo modo, se realizó el abordaje mediante incisión media, extirpando la cicatriz anterior. Se comprueba la dilatación de la vía biliar y se liberan las adherencias necesarias para obtener una buena exposición de la misma y una buena movilización del duodeno.



Figura 6. Vía biliar dilatada.

Para la realización de este trabajo desarrollamos una técnica propia de drenaje biliar interno, mediante la interposición de un catéter de drenaje de 15 mm de longitud (Abbocath-T, 24G x 19 mm[®]) entre el duodeno y la vía biliar dilatada.



Figura 7. Material para drenaje interno y anastomosis.

Se moviliza el asa duodenal y en su borde antimesentérico se introduce un extremo del catéter como se expone en la imagen 7.

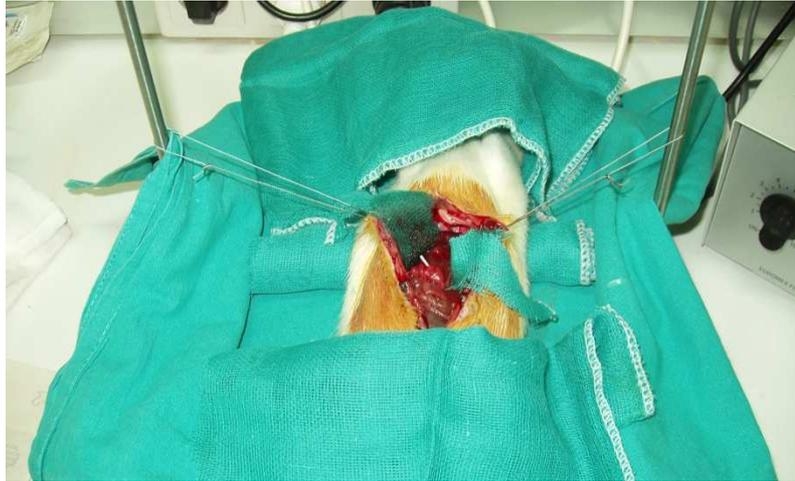


Figura 8. Introducción del catéter en el duodeno.

El otro extremo del catéter se introduce en el conducto biliar dilatado. Se asegura la posición del catéter drenaje mediante puntos sueltos colédocoduodenales con hilo monofilamento irreabsorbible 6/0 (Prolene[®] 6/0, Ethicon).



Figura 9. Anastomosis entre el duodeno y el conducto biliar dilatado.

IV. Administración de anticuerpos anti-TNF

Se empleó un antisuero policlonal de cabra antirata (R & D Systems Inc, Minneapolis, USA). Este preparado se obtiene a partir de cabras inmunizadas con un derivado de *E. coli* purificado, TNF recombinante de rata o rrTNF- α . La inmunoglobulina específica es una IgG, y se purifica mediante cromatografía.

Este anticuerpo tiene la capacidad de neutralizar la actividad biológica del TNF- α de rata, y ejerce una neutralización débil sobre el TNF- α de ratones y nula sobre el de humanos y sobre el TNF- β .

La concentración exacta del anticuerpo necesaria depende de la concentración de la citoquina, del tipo celular, de las condiciones de crecimiento y del tipo de actividad estudiada.

Cada vial del preparado contiene 100 μ g. El vial se reconstituye con 550 μ l de PBS, se distribuye en 5 alícuotas de 110 μ l y se administra una dosis única de 2 μ g a cada rata, que los mantiene en unos niveles circulantes constantes durante una semana.

Se administró por vía intramuscular, a los 14 días de la ligadura del conducto biliar.

V. Sacrificio y obtención de muestras

La vía media de abordaje se amplió mediante incisión subcostal bilateral para obtener una buena exposición del diafragma, que es abierto transversalmente. Se accede a la cavidad torácica y mediante punción del *apex* cardiaco, de cada rata se obtienen 5 ml de sangre aproximadamente, que se dividen en 2 fracciones, una para la obtención de suero en tubos estériles para bioquímica convencional, y otra para el aislamiento de células, para lo que se emplearon tubos estériles EDTA-K3.

El suero se congeló a -20°C hasta la determinación de los parámetros bioquímicos. La sangre contenida en los tubos EDTA-K3 se empleó para la determinación de la generación celular de radicales libres y la actividad fagocitaria así como para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).



Figura 10. Punción cardiaca para obtención de muestras de sangre.

Las muestras de bilis para el análisis microbiológico se obtuvieron por punción directa sobre la vía biliar, con jeringa y aguja de insulina (Sterile PP Syringes 26 G $\frac{1}{2}$ 0,45x12,7 Becton Dickinson and Co, New Jersey, USA) (Imagen 10).

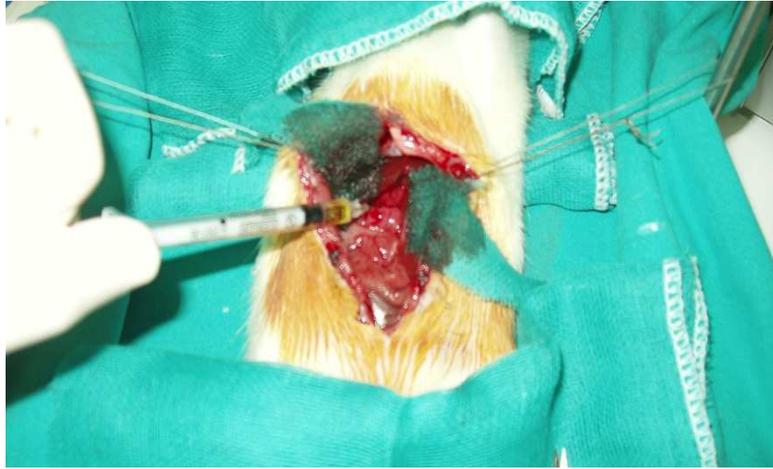


Figura 11. Punción del conducto biliar común para extracción de bilis.

VI. Determinaciones

VI. 1. Variables principales

VI. 1. 1. Mediadores celulares de la respuesta inmune

Se determinó el grado de activación de los mediadores celulares de la respuesta inmune: linfocitos T CD3/Ia, CD4 y CD8, linfocitos B, células mieloides y células NK, antes y después de aplicar los tratamientos que se han comparado.

Esta determinación se realizó mediante el análisis por citometría de flujo de los distintos mediadores celulares; para ello se incubó sangre completa con parejas de anticuerpos monoclonales (anticuerpos marcados y controles negativos recomendados), marcados con diferentes fluorocromos, con las siguientes especificidades:

- **CD3/Ia** (1µl/1µl), como marcador de linfocitos T. El antígeno Ia está codificado por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA de clase II) y es un marcador de activación.
- **CD4** (1µl/1µl), marcador de linfocitos T *helper* o facilitadores.
- **CD8** (1µl/1µl), marcador de linfocitos T supresores.
- **Pan B/Ia** (4µl/1µl), marcador de linfocitos B y de su grado de activación.
- **Células mieloides/CD11b** (2µl/2µl), como marcador de mielocitos y su grado de activación.

- **NK/Ia** (1 μ l/1 μ l), como marcador de activación de células natural killer, células del sistema inmune que eliminan otras células y que no expresan antígenos HLA de clase I.

Los resultados se leyeron por citometría de flujo en un citómetro FACScan (Becton-Dickinson©, San José, CA, EE.UU.), obteniendo porcentajes de células positivas para cada anticuerpo y combinación de anticuerpos.

La población de linfocitos maduros funcionalmente comprende los linfocitos o células T y los B. Poseen actividades biológicas diferentes y pueden ser identificados por sus distintos antígenos glicoproteicos de su membrana celular.

Los linfocitos T maduros CD3 + que expresan en su superficie el antígeno CD4 son responsables de facilitar e inducir la respuesta inmune, mientras que los que expresan CD8 tienen actividad supresora y citotóxica.

El CD3 es una glicoproteína que consta de al menos 5 cadenas con un peso molecular entre 20-25 Kd. La subunidad gamma se encuentra estrechamente relacionada con las cadenas α y β del receptor celular de las células T o TCR.

El complejo CD3/TCR es responsable del reconocimiento de antígenos que son expresados en asociación con los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad; por ello se asume que la molécula CD3 inicia o media la activación de los linfocitos T a través de señales derivadas de la molécula TCR¹⁰⁵.

VI. 1. 1. A. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica

La fracción de sangre aislada en tubos EDTA-K3 se procesa inmediatamente para obtener las células mononucleares de sangre periférica. Los procedimientos se realizan en condiciones estériles, en cámara de flujo.

Se emplearon 3 ml de sangre heparinizada por tubo. Se le añade un volumen igual de PBS filtrado (100 mM para 1 l, se ajusta el pH a 7,4 antes de filtrar). La mezcla se reparte en 2 tubos cónicos de poliestireno de tapón blanco de 30 ml, llenos hasta los $\frac{3}{4}$ de Ficoll filtrado. La sangre se vierte en los tubos con pipetas Pasteur, lentamente para evitar romper la interfase.

A continuación se centrifuga a 2500 rpm durante 20 minutos a 25 °C. De dicha centrifugación se obtienen 3 fracciones (Imagen 11):



Figura 12: Componentes de la sangre centrifugada.

- La primera, en la parte superior, corresponde al plasma.
- La banda intermedia corresponde a las PBMC.
- En el fondo queda el hematocrito (sin las PBMC).

Con pipetas Pasteur se extrae la banda de células mononucleares y se vierte en tubos cónicos de tapón verde estériles con 4 ml de PBS. Se lava después 2 veces más con 8 ml de PBS, se centrifugan a 1500 rpm a 20 °C.

Una vez aisladas las PBMC se contaron en cámara de Neubauer distribuyéndose en tubos especiales para citometría de flujo, entre 100.000 y 150.000 células por tubo y por determinación.

A cada tubo se le añadió su correspondiente anticuerpo monoclonal (Tabla 1) marcado con fluorocromo, fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (RPE), a las dosis y al tiempo de incubación indicado por la casa comercial, en oscuridad y a temperatura ambiente:

Tabla 1. Isotipos y casas comerciales

CD3	FITC	IgM	Caltag Laboratories©, San Francisco, CA, US
Ia	RPE	IgG1	Serotec Ltd, Oxford, England
CD4	RPE	IgG1	Caltag Laboratories©, San Francisco, CA, US
CD8	FITC	IgG1	Caltag Laboratories©, San Francisco, CA, US
Pan B	FITC	IgG2a	Caltag Laboratories©, San Francisco, CA, US
Fagocitos	RPE	IgG1	Serotec Ltd, Oxford, England
CD11b	FITC	IgG2a	Caltag Laboratories©, San Francisco, CA, US
NKR-P1	FITC	IgG1	Serotec Ltd, Oxford, England

VI. 1. 1. b. Subpoblaciones leucocitarias y su grado de activación

Las células se incuban con el correspondiente anticuerpo monoclonal. Se lavan con solución de lisis y con PBS 0,1 % azida sódica. Por último se resuspenden en Sheath fluid 0,5 % formaldehído para su inmediata adquisición en el citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson©, San José, CA, EE.UU.). El programa de adquisición que se utilizó fue el PC-Lysis II, incluido en el paquete informático del citómetro.

De cada tubo se obtiene un *dot-plot* o distribución bidimensional de puntos. Cada punto equivale a un evento o célula, situada en el gráfico según su tamaño y complejidad (Figura 13). Con el mismo programa se seleccionan las regiones R1, R2 y R3, que corresponden a las localizaciones de los linfocitos, los monocitos-macrófagos y los granulocitos, respectivamente. Por último, existe una región negativa denominada D (del inglés *debricit*) que corresponde a detritus celulares.

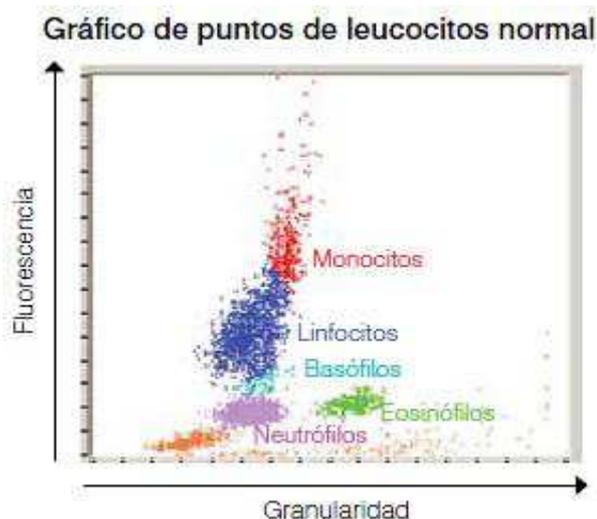


Figura 13. Imagen del *dot-plot* normal.

Después se selecciona cada región para obtener una representación bidimensional de doble fluorescencia; aquí las células se separan por el tipo de fluorescencia que emiten, FL1 (FITC) o FL2 (RPE). Se obtienen porcentajes de células que emiten la fluorescencia del número total de eventos.

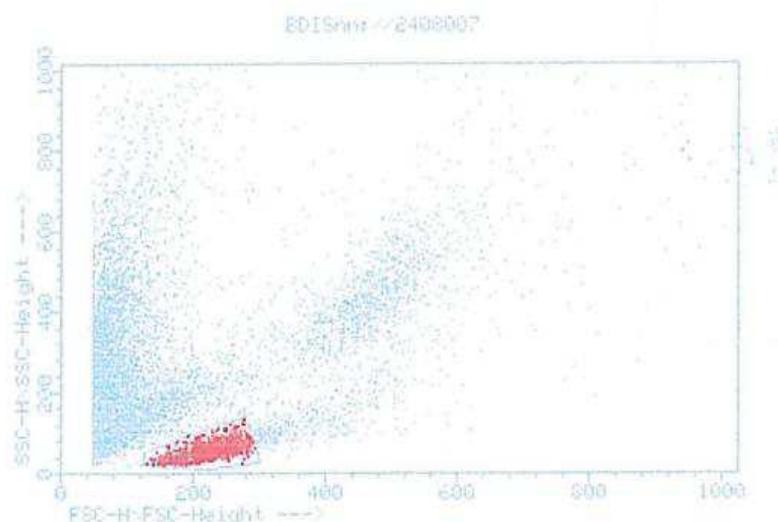


Figura 14. Imagen de un *dotplot* de nuestro estudio.

VI. 2. Variables secundarias

VI. 2. 1. Análisis de la capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos

VI. 2. 1. a. Rodamina

Se incubó sangre completa heparinizada con 1,2,3 Dihidrorodamina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). Cuando este compuesto es fagocitado por los neutrófilos y macrófagos, es oxidado y se convierte en Rodamina, que presenta fluorescencia. La cuantificación de esta fluorescencia en el citómetro de flujo informa sobre la capacidad oxidativa de las células en estudio.

Este parámetro se lee como índice normal oxidativo (NOI), dividiendo el valor medio de la fluorescencia de las células estimuladas por el valor medio de las células no estimuladas.

VI. 2. 1. b. Tuftsina

Para la determinación de la capacidad fagocítica, habitualmente se utilizan bacterias marcadas con fluorocromo preopsonizadas con suero humano, lo que hace menos adecuado este método reactivo cuando se utiliza para medir la capacidad fagocítica en animales de experimentación. En este sentido, se empleó Tuftsina marcada con un fluorocromo (Tuftsin Fluorescein Conjugate. Molecular Probes[®], The Netherlands), susceptible de ser utilizada tanto en animales como humanos.

Se incubó sangre completa heparinizada con la Tuftsina marcada con fluorocromo. Se cuantificó en el citómetro de flujo la cantidad de fluorescencia captada por los Neutrófilos y Macrófagos.

La capacidad de fagocitosis con Tuftsina se lee como porcentaje de células positivas o como índice normal de fagocitosis, dividiendo el valor medio de la fluorescencia de las células incubadas por el valor medio de las células no incubadas.

VI. 2. 2. Mediadores solubles de la respuesta inmune: niveles serológicos de TNF- α

La medición del TNF- α circulante en plasma se realizó mediante una técnica de ELISA indirecto competitivo (Biosource Internacional, Inc. California USA).

VI. 2. 3. Determinación de endotoxinas en sangre periférica

La detección de endotoxinas se realizó mediante el kit comercial E-ETOXATE[®], preparado a partir de un lisado de amebocitos procedentes del *Limulus polyphemus*.

Cuando se expone a determinadas concentraciones de endotoxinas, el lisado aumenta en opacidad y puede gelificar dependiendo de la concentración de endotoxina.

En el procedimiento se utilizan 9 tubos estériles de poliestireno, etiquetados de la A a la I. Los tubos A y B se emplean para cada muestra. Los restantes sirven para determinar la sensibilidad del método y como controles.

La lectura se consideró positiva (+) cuando se observa una estructura gelatinosa sin ser una formación de gel compacta; y negativa (-) cuando no se forma estructura gelatinosa.

El resultado negativo puede indicar la existencia de un factor en la muestra que impide la reacción (ausencia de formación de gel en el tubo B y presencia del mismo en el tubo D).

VI. 2. 4. Estudio microbiológico de la bilis

La toma de las muestras se realizó mediante punción directa en el conducto biliar común con jeringa y aguja de insulina estériles (Sterile PP Syringes 26 G ½ 0,45x12,7 Becton Dickinson and Co, New Jersey, USA) como se mencionó anteriormente.

VI. 2. 4. a. Siembra y medios de cultivo

Se emplearon los medios de cultivo de Cled, medio sólido que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos y los medios líquidos TSB (caldo con soja tréptica, para fortalecer los gérmenes aerobios que no hayan crecido en el Cled) y Tioglicolato, para el crecimiento microorganismos anaerobios y microaerófilos .

La incubación se realizó a 37 °C durante un período variable pero en general entre 24 y 48 horas. Se realizó una segunda siembra del caldo TSB en los medios agar sangre, agar chocolate y McConkey.

VI.2. 4. b. Lectura y valoración

Se realizó una primera lectura a las 24 horas del cultivo, si en las placas no hubo crecimiento de microorganismos se prolongó la incubación hasta las 48 horas y se realizó una nueva lectura. A los microorganismos detectados se les realizó la tinción de Gram.

VI. 3. Variables complementarias

VI. 3. 1. Parámetros bioquímicos: daño hepatocelular y colestasis

Las mediciones de los niveles en suero de glucosa, urea, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAlc) y bilirrubina total se realizaron con el autoanalizador bioquímico Axon (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Se recogieron los niveles de Urea y Creatinina en mg/dL, de ALT, AST y FAlc en UI/L y de bilirrubina total en mg/dL.

VII. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos consistió en:

VII. 1. Análisis descriptivo con cálculo de la media y desviación típica, valores mínimos y máximos, así como los intervalos de confianza de la media o diferencias de medias al 95% de confianza.

VII. 2. Comparaciones de los valores medios mediante el test ANOVA de un factor. Si los datos eran compatibles con distribuciones normales, por el test de Shapiro y Wilk; mediante la prueba de Kruskal-Wallis cuando los datos no seguían una distribución normal.

Las comparaciones de medias a posteriori para el análisis de varianza se realizaron con el test de la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Cuando se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, se utilizaron los test de Mann-Whitney como comparaciones a posteriori, aplicándose, en este caso, la corrección de Hommel (corrección modificada de Bonferroni).

VII. 3. En todas las pruebas estadísticas se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$ y los contrastes de hipótesis fueron bilaterales.

Para el tratamiento y análisis posterior de los datos se utilizó el programa IBM® SPSS® Statistics Versión 20.

RESULTADOS

I. Efectos biológicos observados en la ictericia obstructiva experimental tras 14 y 21 días de obstrucción biliar

I. 1. Lesión hepatocelular y colestasis

La ligadura del conducto biliar determinó un incremento significativo de la enzima de citolisis hepática AST en el grupo de 21 días de obstrucción biliar ($469,38 \pm 104,36$ UI/L) con respecto al grupo de obstrucción biliar durante 14 días ($317,66 \pm 62,76$ UI/L; $p=0,024$) y respecto al grupo control de operación simulada (OS) ($114,84 \pm 33,66$; $p=0,00$).

Con la ALT solo hubo diferencia significativa con el grupo de OS ($43,34 \pm 11,06$ UI/L vs $15,47 \pm 3,56$ UI/L; $p=0,013$) pero no con el de IO-14 días ($42,18 \pm 15,88$, $p=1$).

En cambio, los valores séricos medios de FAlc se elevaron tras 14 días de obstrucción biliar y disminuyeron a los 21 días de la ligadura del conducto biliar, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($314,32 \pm 62,94$ UI/L vs $230,82 \pm 19,42$ UI/L; $p=0,084$). Si hubo diferencia significativa entre los grupos de obstrucción biliar tanto durante 14 días como durante 21 días, con el grupo de OS.

Los valores de bilirrubina presentaron un comportamiento similar, existiendo solo diferencia estadística entre el grupo de IO-21 días y el de OS (Tabla 2, Figuras 15 y 16).

Tabla 2. Valores medios y desviación típica de enzimas de citolisis y colestasis (intervalo de confianza 95%). Valor p: diferencias entre las medias.

Variable	Grupo OS	Grupo IO-14 días	p (OS vs IO-14 d)	Grupo IO-21 días	p (OS vs IO-21 d)
AST(UI/L)	114.8 ± 33.6	317,7 ± 62,8	0.005	469,4 ± 104,4	0.000
ALT (UI/L)	15,7 ± 3,6	35,4 ± 5,2	0.019	43,34 ± 11,1	0.013
FAlc (UI/L)	92.5 ± 11.2	314,3 ± 62,9	0.049	230,8 ± 19,4	0.049
Bilirrubina (mg/dL)	0,06 ± 0,05	2,6 ± 0,08	0.048	4,3 ± 1,4	0.048

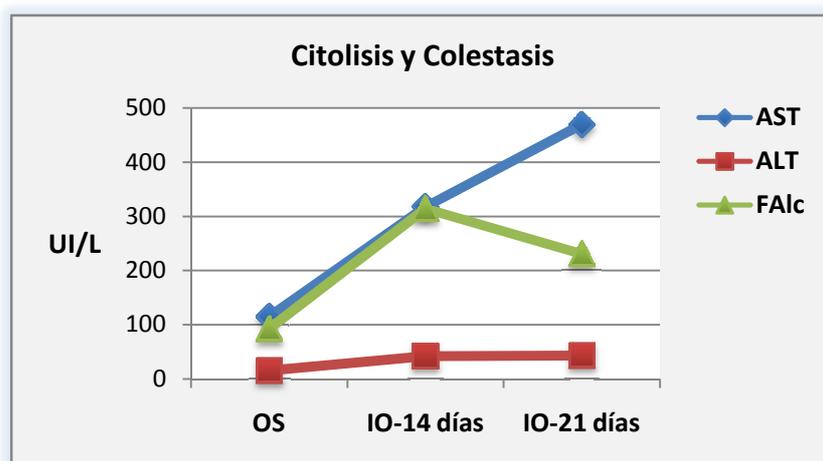


Figura 15. Valores medios de AST, ALT y FAlc en los grupos de operación simulada (OS), Ictericia-14 días e Ictericia-21 días.

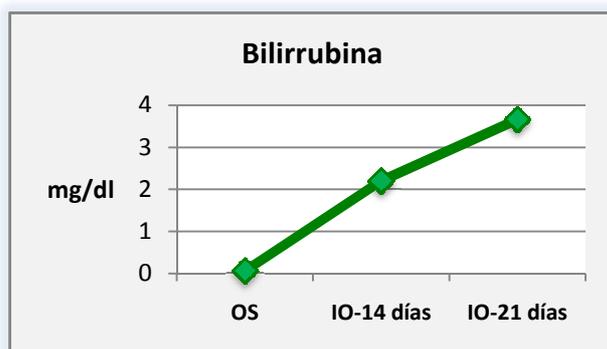


Figura 16. Valores medios de Bilirrubina en los grupos de operación simulada (OS), Ictericia-14 días e Ictericia-21 días.

I. 2. Inmunidad celular específica

Como se explicó anteriormente, se realizó un análisis mediante citometría de flujo para determinar en sangre periférica el porcentaje de Linfocitos T CD3 activados, linfocitos T CD4 y CD8 y linfocitos B/la.

En el grupo de IO durante 21 días se observó una disminución significativa del porcentaje medio de Linfocitos CD3/la con respecto al grupo de IO durante 14 días ($19,5 \pm 14,7$ vs $47,9 \pm 10,2$; $p=0,002$); también disminuyó respecto al grupo control de OS pero en este caso la diferencia no fue significativa ($19,5 \pm 14,7$ vs $25,3 \pm 8,3$; $p=0,891$) (Tabla 3, figura 17).

En cambio, en el grupo de IO durante 14 días hubo un incremento significativo de los linfocitos CD3/la con respecto al control de OS ($47,9 \pm 10,2$ vs $25,3 \pm 8,3$; $p=0,017$).

Igualmente, se observó una disminución en el porcentaje medio de linfocitos T CD4 y CD8 en el grupo de ictericia más prolongada con respecto al grupo de Ictericia-14 días y con respecto al grupo control, aunque solo de manera significativa para la población de linfocitos T CD8, como también se detalla en la tabla 3.

Los linfocitos CD8 tuvieron un comportamiento similar a los linfocitos CD3/la, aumentaron a los 14 días de la obstrucción biliar y disminuyeron a los 21 días de la inducción de la ictericia.

El porcentaje medio de linfocitos B activados fue menor en el grupo de Ictericia-21 días con respecto al grupo de Ictericia-14 días y con el grupo de OS aunque sin diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Tabla 3. Porcentajes (media y desviación típica) de las distintas subpoblaciones linfocitarias en los grupos de trabajo (OS: Operación Simulada, Ictericia-14 días e Ictericia 21-días) (IC 95%). Valor p: diferencias entre las medias.

Subpoblaciones linfocitos (% medio)	Grupo OS	Grupo IO-14 días	p (OS vs IO-14 d)	Grupo IO-21 días	p (OS vs IO-21 d)
CD3/la	25,3±8,3	47,9±10,2	0.017	19,5±14,7	0.891
CD4	50,3±12,9	45,7±7,3	0.602	37,3±8,3	0.602
CD8	11,6±5.5	17,9±1,9	0.031	5,2±2,2	0.029
Pan B/la	7,7±6,7	14,5±7,2	0.199	4,7±5,3	0.199

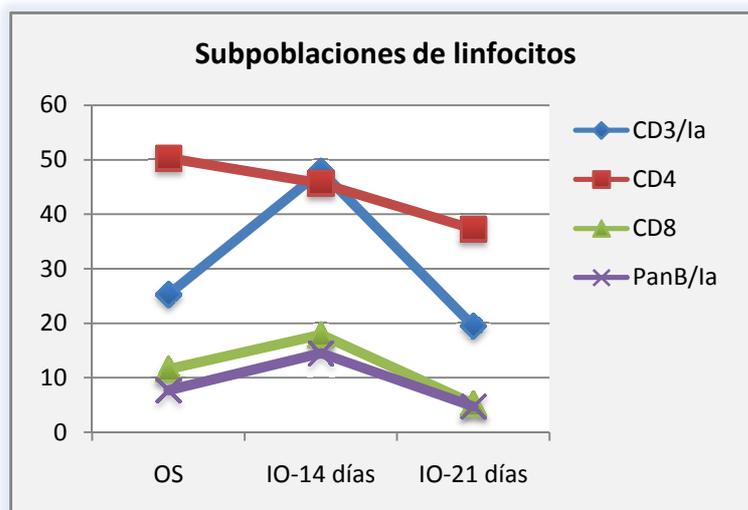


Figura 17. Porcentaje medio de expresión de linfocitos T CD3/la, CD4, CD8 y B/la en los grupos de Operación simulada, Ictericia-14 días e Ictericia-21 días.

I. 3. Inmunidad celular inespecífica

Mediante el análisis por citometría de flujo se determinó el porcentaje de Monocitos-Macrófagos y Granulocitos activados CD11b y el porcentaje de células NK activadas (NK/la).

Se observó un incremento significativo del porcentaje medio de Monocitos-Macrófagos activados a los 14 días de la obstrucción biliar con respecto al grupo control de operación simulada (OS). En el grupo de Ictericia-21 días el porcentaje descendió a niveles similares al grupo de OS con el que no mostró diferencia significativa (Tabla 4, figura 18).

El porcentaje de Granulocitos CD11b activados descendió discretamente en el grupo de Ictericia-14 días con respecto al grupo de OS, y disminuyó de manera más marcada en el grupo de Ictericia-21 días, aunque las diferencias no fueron significativas.

Con respecto al grado de activación de las células NK tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Tabla 4. Porcentaje (media y desviación típica) de Monocitos-Macrófagos, Granulocitos y células NK activados en los grupos de OS (Operación Simulada), Ictericia-14 días e Ictericia-21 días (IC 95%). Valor p: diferencias entre las medias.

Subpoblaciones celulares (% medio)	Grupo OS	Grupo IO-14 días	p (OS vs IO-14 d)	Grupo IO-21 días	p (OS vs IO-21 d)
Monocitos-Macrófagos CD11b	33,5±7,6	66,4±10,7	0.000	31,0±6,7	0.995
Granulocitos CD11b	77,8±22,1	73,7±8,4	0.917	43,8±16,9	0.168
Células NK/Ia	2,8±1,0	3,5±0,6	0.823	3,7±2,5	0.823

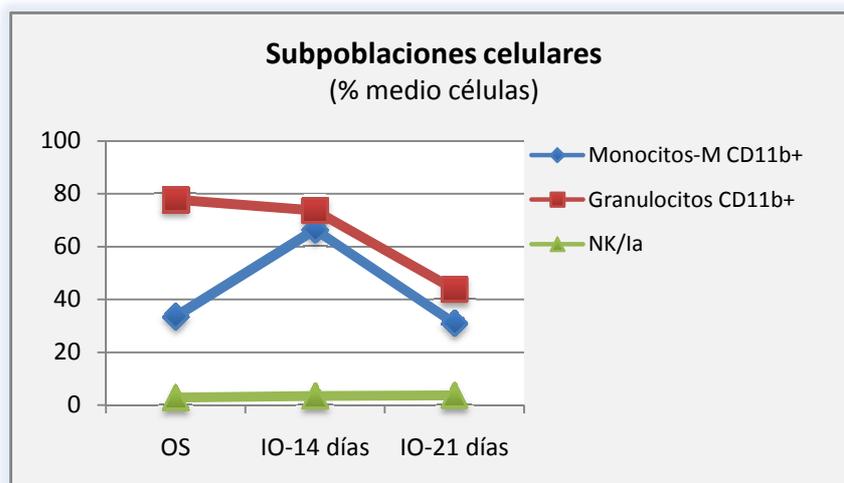


Figura 18. Porcentaje medio de Monocitos-Macrófagos, Granulocitos y células NK activadas en los grupos de OS (Operación Simulada), IO-14 días (Ictericia-14 días) e IO-21 días (Ictericia-21 días).

I. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Test de la Rodamina y Tuftsina

La capacidad oxidativa media de los granulocitos neutrófilos como de los macrófagos determinada mediante el test de la Rodamina no mostró diferencias significativas entre el grupo control de OS y los grupostanto de Ictericia-14 días como con el grupo de ictericia más prolongada (Tabla 5, figura 19).

La capacidad fagocítica media se determinó mediante el Test de Tuftsina. Tampoco se observaron diferencias significativas en la capacidad fagocítica de los granulocitos neutrófilos ni de los macrófagos entre estos tres grupos experimentales.

Tabla 5. Fluorescencia (media y desviación típica) con Rodamina y Tuftsina de granulocitos neutrófilos y macrófagos en los grupos de OS, Ictericia-14 días e Ictericia-21 días (IC 95%).

Capacidad oxidativa y fagocítica (% fluorescencia media)	Grupo OS	Grupo IO-14 días	Grupo IO-21 días	p
Rodamina Neutrófilos	12,2±11,4	3,0±2,9	7,2±9,4	0.272
Rodamina Macrófagos	1,9±2,4	,0±,0	5,0±7,2	0.189
Tuftsina Neutrófilos	1,7±0,7	1,6±0,4	1,8±1,8	0.127
Tuftsina Macrófagos	6,4±3,4	1,8±1,5	2,9±2,7	0.138

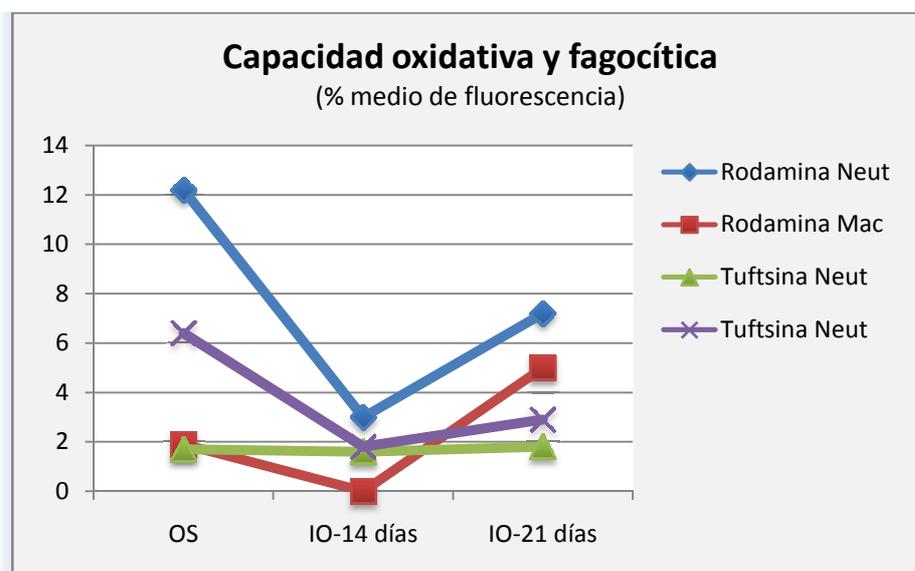


Figura 19. Fluorescencia media con Rodamina y Tuftsina de neutrófilos y macrófagos en los grupos de OS, Ictericia-14 días e Ictericia-21 días.

I.5. Niveles de TNF- α en sangre periférica

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α entre estos grupos del trabajo (Figura 20).

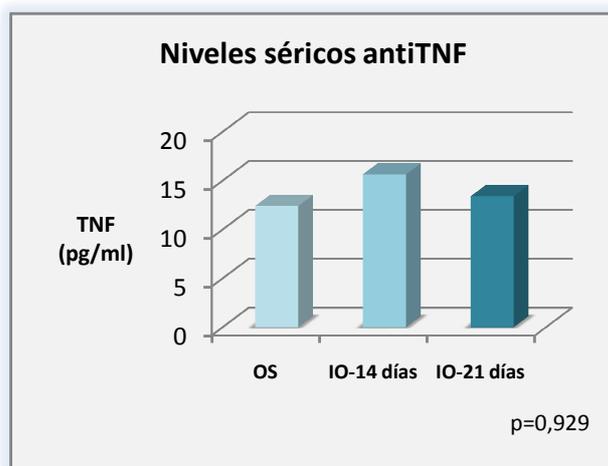


Figura 20. Niveles séricos medios de TNF- α en los distintos grupos de trabajo.

I. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica

La detección de endotoxinas en sangre periférica fue más frecuente en el grupo de Operación Simulada con respecto a los grupos de ictericia aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Número total y porcentajes de detección de endotoxinas en sangre periférica en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Grupo OS	Grupo IO-14 días
Operación simulada	4 (66,7%)	2 (33,3%)
IO-14 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)
IO-21 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)

P=0,155

I. 7. Estudio microbiológico de la bilis

El aislamiento de bacterias en bilis fue significativamente mayor en el grupo de ictericia prolongada (Tabla 7).

Tabla 7. Número total y porcentaje de cultivos positivos y negativos en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Cultivo (+)	Cultivo (-)
Operación simulada	1 (16,7%)	5 (83,3%)
IO-14 días	4 (66,7%)	2 (33,3%)
IO-21 días	5 (83,3%)	1 (16,7%)

P=0,016

II. Efectos del drenaje biliar interno en la ictericia obstructiva experimental

Se realizó la técnica de drenaje biliar interno descrita anteriormente a los 14 días de la ligadura del conducto biliar y el sacrificio y obtención de muestras a los 21 días. Se emplearon el grupo Operación Simulada (OS) y el grupo de Ictericia-21 días como grupos control.

II. 1. Lesión hepatocelular y colestasis

La realización del drenaje biliar interno disminuyó significativamente el valor medio de la AST, ALT, FAlc y Bilirrubina con respecto al grupo de Ictericia-21 días. Estos valores observados en el grupo de drenaje fueron muy similares a los del grupo control de operación simulada (OS) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores medios de enzimas de citolisis y colestasis (media y desviación típica, IC 95%) en los grupos de drenaje biliar interno e ictericia durante 21 días.

Variables	Drenaje biliar	Operación Simulada	p (Drenaje vs OS)	IO-21 días	p (Drenaje vs IO-21 d)
AST(UI/L)	126,98±30,35	114,84±33,66	0.999	469,38±104,36	0.000
ALT(UI/L)	14,85±3,40	15,74±3,56	0.991	43,34±11,06	0.002
FAlc(UI/L)	96,46±19,21	92,46±11,16	0.465	230,82±19,42	0.000
Bilirrubina (mg/dL)	0,08±0,04	0,06±0,05	0.513	4,31±1,37	0.000

II. 2. Inmunidad celular específica

En el grupo de drenaje biliar interno se incrementaron los porcentajes de linfocitos T CD4, CD8 y linfocitos B/la con respecto al grupo de ictericia durante 21 días, aunque de manera significativa en los CD8; no se observaron diferencias significativas con el grupo control de OS. Aunque en el grupo de drenaje el porcentaje de linfocitos T CD3/la fue menor, la diferencia con el grupo Ictericia-21 días en esta subpoblación de linfocitos no fue significativa. Tampoco se observaron diferencias con el grupo de OS (Tabla 9, figura 21).

Tabla 9. Porcentaje (media y desviación típica) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y grado de significación entre el grupo de tratamiento mediante drenaje biliar interno y los grupos control Ictericia-21 días y Operación simulada (OS).

Subpoblaciones linfocitarias (% medio)	Drenaje biliar	Operación Simulada	p (Drenaje vs OS)	IO-21 días	p (Drenaje vs IO-21 d)
Linfocitos TCD3/la	13,11±2,81	25,3±8,3	0.357	19,5±14,7	0,861
Linfocitos T CD4	62,5±4,7	50,3±12,9	0.380*	37,3±8,3	0,050*
Linfocitos T CD8	13,2±1,6	11,6±5,5	0.917	5,2±2,2	0,005
Linfocitos B/la	5,3±0,9	7,7±6,7	0.199	4,7±5,3	0,199

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

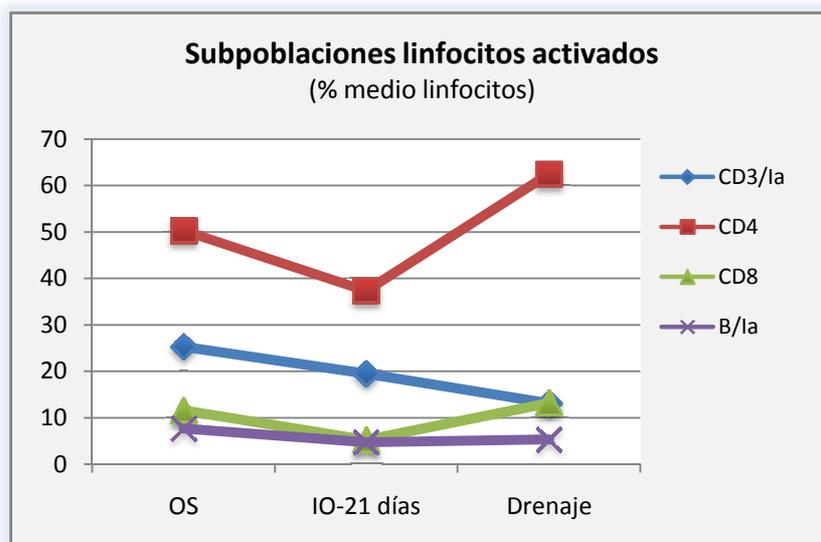


Figura 21. Porcentaje medio de las distintas poblaciones linfocitarias en los grupos OS, Ictericia-21 días y drenaje biliar.

II. 3. Inmunidad celular inespecífica

En el grupo de tratamiento mediante la técnica de drenaje biliar se observó un incremento significativo de los Monocitos-Macrófagos CD11 activados con respecto al grupo de ictericia prolongada y no mostró diferencias significativas con el grupo de operación simulada.

El porcentaje de Granulocitos CD11 activados experimentó un descenso significativo en el grupo de ictericia que se recuperó en el grupo de drenaje hasta valores similares a los del control de operación simulada.

El porcentaje de células NK activadas no mostró diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 10, figura 22).

Tabla 10. Porcentaje de las distintas subpoblaciones celulares de inmunidad inespecífica (media y desviación típica, IC 95%) en el grupo de tratamiento con drenaje biliar frente a los grupos de operación simulada e ictericia obstructiva durante 21 días.

Subpoblaciones celulares (% medio)	Drenaje biliar	Operación Simulada	p (Drenaje vs OS)	IO-21 días	p (Drenaje vs IO-21 d)
Monocitos-Macrófagos CD11b	52,0±7,9	33,5±7,6	0.060	31,0±6,7	0.026
Granulocitos CD11b	84,8±15,8	77,8±22,1	0.700*	43,8±16,9	0.050*
Células NK/la	3,2±0,4	2,8±1,0	0.823	3,7±2,5	0.823

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

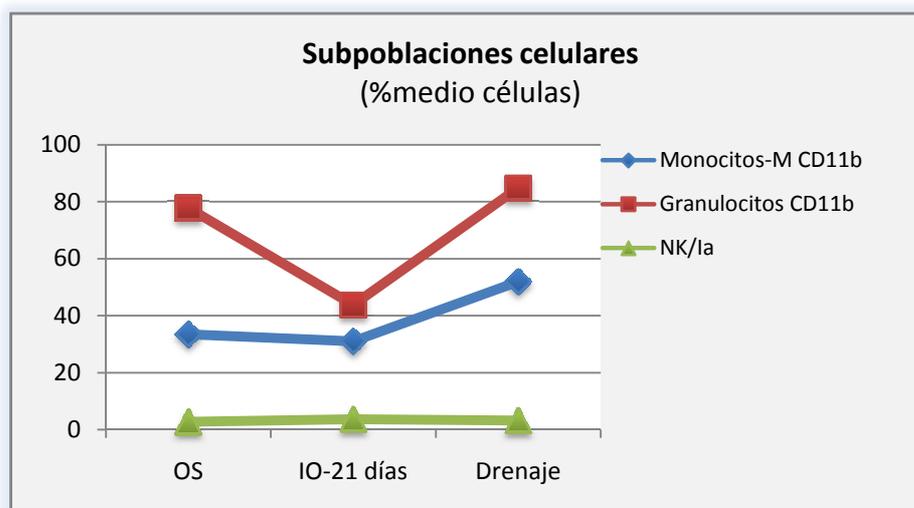


Figura 22. Subpoblaciones celulares de inmunidad inespecífica en los grupos de tratamiento con drenaje biliar interno e Ictericia-21 días.

II. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Rodamina y Tuftsina

La capacidad oxidativa de los Neutrófilos y Monocitos-Macrófagos (Test de Rodamina) no mostró diferencias significativas entre los tres grupos.

La capacidad fagocítica (Test de Tuftsina) de las poblaciones de Neutrófilos y Macrófagos en el grupo de tratamiento con drenaje biliar experimentó un incremento con respecto a los dos grupos control, aunque las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Tabla 11, figura 23).

Tabla 11. Fluorescencia (media y desviación típica) con Rodamina y Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en el grupo de tratamiento con drenaje biliar interno y los controles de operación simulada e Ictericia-21 días (IC 95%).

Capacidad oxidativa y fagocítica (% fluorescencia media)	Drenaje biliar	Operación Simulada	p (Drenaje vs OS)	IO-21 días	p (Drenaje vs IO-21 d)
Rodamina Neutrófilos	7,6±2,5	12,2±11,4	0.272	7,2±9,4	0.272
Rodamina M-Macrófagos	0,0±0,0	1,9±2,4	0.189	5,0±7,2	0.189
Tuftsina Neutrófilos	3,0±0,5	1,7±0,7	0.127	1,8±1,8	0.127
Tuftsina M-Macrófagos	8,0±4,2	6,4±3,4	0.915	2,9±2,7	0,082

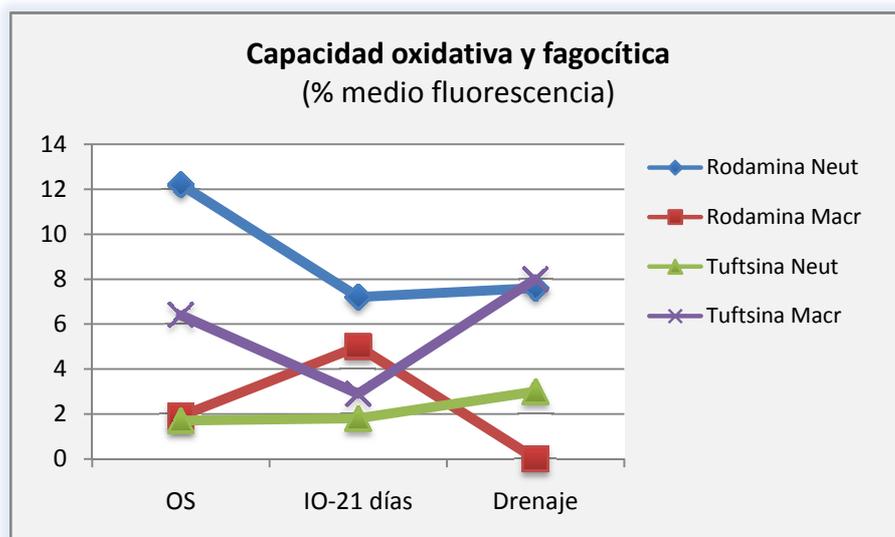


Figura 23. Fluorescencia media con Rodamina y Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en el grupo de tratamiento con drenaje biliar interno y los controles Operación Simulada e Ictericia-21 días.

II. 5. Niveles de TNF- α en sangre periférica

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α en los distintos grupos del trabajo (Figura 24).

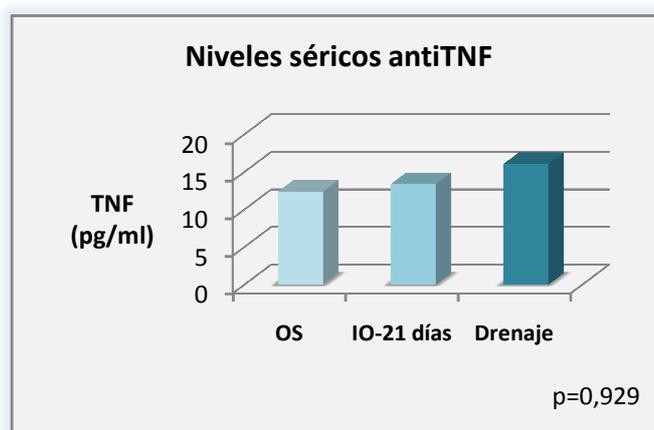


Figura 24. Niveles séricos medios de TNF- α en los distintos grupos de trabajo.

II. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica

La detección de endotoxinas en sangre periférica fue más frecuente en el grupo de Operación Simulada con respecto a los grupos de ictericia y de drenaje biliar aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 12).

Tabla 12. Número total y porcentajes de detección de endotoxinas en sangre periférica en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Endotoxinas (+)	Endotoxinas (-)
Operación simulada	4 (66,7%)	2 (33,3%)
IO-21 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Drenaje	2 (33,3%)	4 (66,7%)

p=0,155

II. 7. Estudio microbiológico de la bilis

El aislamiento de bacterias en bilis fue significativamente mayor en el grupo de ictericia prolongada y en el grupo en el que se realizó el drenaje biliar interno (Tabla 13).

Tabla 13. Número total y porcentaje de cultivos positivos y negativos en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Cultivo (+)	Cultivo (-)
Operación simulada	1 (16,7%)	5 (83,3%)
IO-21 días	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Drenaje	5 (83,3%)	1 (16,7%)

p=0,016

III. Efectos de los anticuerpos anti-TNF en la ictericia obstructiva experimental

Como se explicó anteriormente, se administró una dosis única de anticuerpos anti-TNF- α (R & D Systems Inc, Minneapolis, USA, 20 μ g intramuscular) a los 14 días de la ligadura del conducto biliar y el sacrificio y obtención de muestras a los 21 días; se emplearon el grupo de Operación Simulada y el grupo Ictericia-21 días como grupos control.

III. 1. Lesión hepatocelular y colestasis

La administración de anticuerpos anti-TNF- α disminuyó los valores medios de la AST, ALT, FAlc y Bilirrubina con respecto al grupo de Ictericia-21 días aunque solamente los de AST de manera significativa. No hubo diferencias significativas con el grupo control de Operación Simulada salvo también en los valores medios de AST (Tabla 14).

Tabla 14. Valores medios de enzimas de citolisis y colestasis (media y desviación típica, IC 95%) en los grupos de administración de anti-TNF- α y los controles Operación Simulada e ictericia durante 21 días.

Variables	Anti-TNF- α	Operación Simulada	p (anti-TNF- α vs OS)	IO-21 días	p (antiTNF- α vs IO-21 d)
AST (UI/L)	289,8 \pm 119,3	114,8 \pm 33,7	0.017	469,4 \pm 104,4	0,014
ALT (UI/L)	30,7 \pm 17,4	15,7 \pm 3,6	0.320	43,3 \pm 11,1	0,484
FAlc (UI/L)	173,7 \pm 96,2	92,5 \pm 11,2	0.465	230,8 \pm 19,4	0,465
Bilirrubina (mg/dL)	1,9 \pm 2,6	0,1 \pm 0,1	0.085	3,7 \pm 1,9	0.418

III. 2. Inmunidad celular específica

La administración de anticuerpos anti-TNF- α incrementó los porcentajes medios de linfocitos T CD3 activados, linfocitos T CD4 y CD8 y linfocitos B/la con respecto al grupo de Ictericia-21 días, aunque de manera significativa en la subpoblación de los CD8. Los valores observados en el grupo de tratamiento con anti-TNF- α fueron muy similares a los del grupo control de Operación Simulada (Tabla 15, figura 25).

Tabla 15. Porcentaje (media y desviación típica) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y grado de significación entre el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α y los grupo control Operación Simulada e Ictericia-21 días.

Subpoblaciones linfocitarias (% medio)	Anti-TNF- α	Operación Simulada	p (anti-TNF- α vs OS)	IO-21 días	p (antiTNF- α vs IO-21 d)
Linfocitos T CD3/la	22,9 \pm 11,1	25,3 \pm 8,3	0.996	19,5 \pm 14,7	0,982
Linfocitos T CD4	46,5 \pm 14,5	50,3 \pm 12,9	0.602*	37,3 \pm 8,3	0,468*
Linfocitos T CD8	12,6 \pm 2,4	11,6 \pm 5,5	0.986	5,2 \pm 2,2	0,010
Linfocitos B/la	6,5 \pm 4,9	7,7 \pm 6,7	0.199	4,7 \pm 5,3	0.199

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

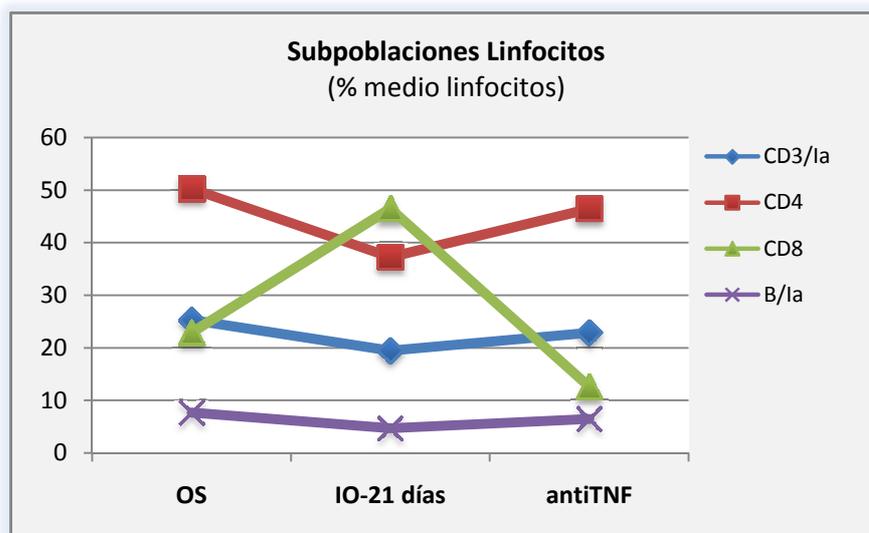


Figura 25. Porcentaje medio de las distintas poblaciones linfocitarias en los grupos anti-TNF- α y control Operación Simulada e Ictericia-21 días

III. 3. Inmunidad celular inespecífica

En el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α se observó un incremento de los Monocitos-Macrófagos y Granulocitos CD11 activados alcanzando valores similares a los observados en el control de Operación Simulada. El incremento fue significativo en la subpoblación de Granulocitos con respecto al grupo de ictericia prolongada.

El porcentaje de células NK activadas fue menor en el grupo de tratamiento, pero la diferencia no fue significativa (Tabla 16, figura 26).

Tabla 16. Porcentaje de las distintas subpoblaciones celulares de inmunidad inespecífica (media y desviación típica, IC 95%) en el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α y en los grupo control Operación Simulada e ictericia obstructiva durante 21 días.

Subpoblaciones celulares (% medio)	Anti-TNF- α	Operación Simulada	p (anti-TNF- α vs OS)	IO-21 días	p (antiTNF- α vs IO-21 d)
Monocitos-Macrófagos CD11b	47,1 \pm 15	33,5 \pm 7,6	0.246	31 \pm 6,7	0.125
Granulocitos CD11b	84,1 \pm 8,6	77.8 \pm 22,1	0.917	43,8 \pm 16,9	0.050*
Células NK/la	3 \pm 0,8	2,8 \pm 1	0.823	3,7 \pm 2,50	0.823

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

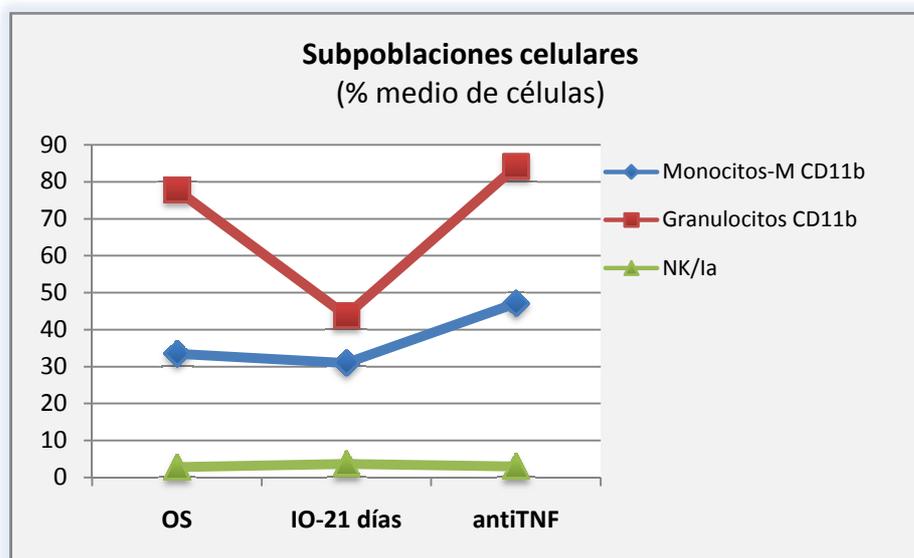


Figura 26. Subpoblaciones celulares de inmunidad inespecífica en el grupo de tratamiento con anti-TNF- α y los grupos control Operación Simulada e Ictericia-21 días.

III. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Rodamina y Tuftsina

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad oxidativa (Test de Rodamina) y fagocítica (Test de Tuftsina) de las poblaciones de Neutrófilos y Macrófagos entre el grupo de tratamiento con anti-TNF- α y el grupo de ictericia durante 21 días.

El grupo de tratamiento con anti-TNF- α presentó valores muy similares a los del control de Operación Simulada, no existiendo diferencias significativas entre ambos (Tabla 17, figura 27).

Tabla 17. Fluorescencia (media y desviación típica) con Rodamina y Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en el grupo de tratamiento con anti-TNF- α y en los grupos control Operación Simulada e Ictericia-21 días (IC 95%).

Capacidad oxidativa y fagocítica (% fluorescencia media)	Anti-TNF- α	Operación Simulada	p (anti-TNF- α vs OS)	IO-21 días	p (antiTNF- α vs IO-21 d)
Rodamina Neutrófilos	12,2 \pm 6,2	12,2 \pm 11,4	0.272	7,2 \pm 9,4	0.272
Rodamina M-Macrófagos	2,5 \pm 2,2	1,9 \pm 2,4	0.189	5 \pm 7,2	0.189
Tuftsina Neutrófilos	1,5 \pm 0,4	1,7 \pm 0,7	0.127	1,8 \pm 1,8	0,127
Tuftsina M-Macrófagos	4,5 \pm 2,3	6,4 \pm 3,4	0.186	4,6 \pm 3	0,995

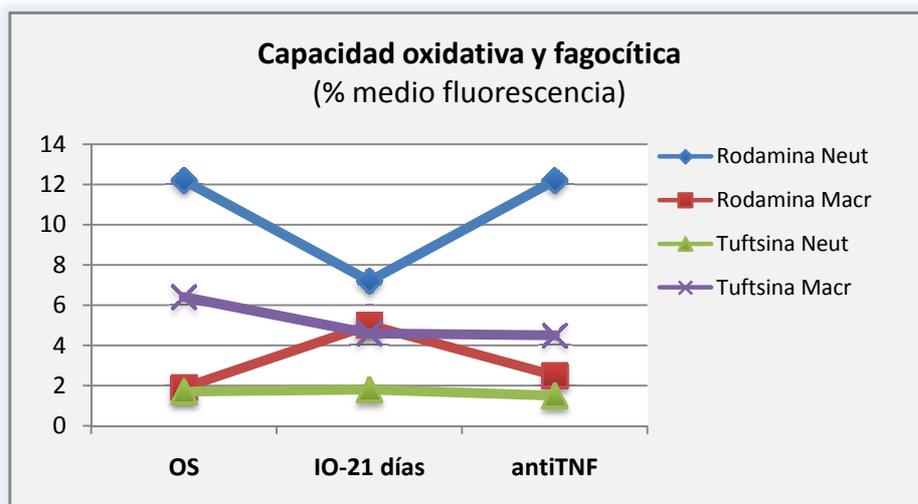


Figura 27. Fluorescencia media con Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en el grupo de tratamiento con anti-TNF- α y en los grupos control Operación Simulada e Ictericia -21 días.

III. 5. Niveles de TNF- α en sangre periférica

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α en los distintos grupos del trabajo (Figura 28).

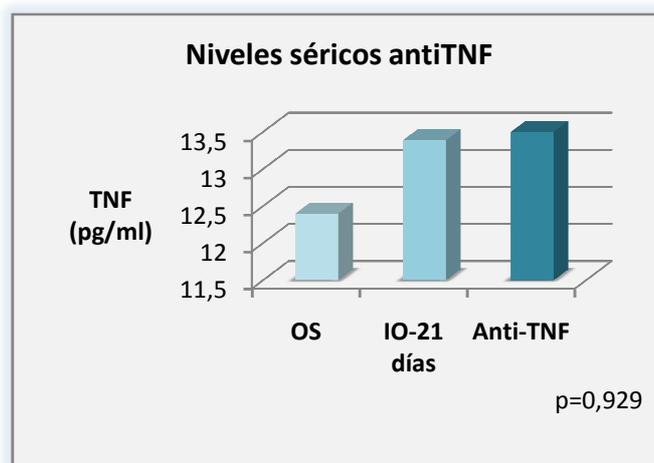


Figura 28. Niveles séricos medios de TNF- α en los distintos grupos de trabajo.

III. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica

La detección de endotoxinas en sangre periférica fue más frecuente en el grupo de Operación Simulada y en el que se administró anti-TNF- α con respecto a los grupos de ictericia aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 18).

Tabla 18. Número total y porcentajes de detección de endotoxinas en sangre periférica en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Endotoxinas (+)	Endotoxinas (-)
Operación simulada	4 (66,7%)	2 (33,3%)
IO-21 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Anti-TNF- α	4 (66,7%)	2 (33,3%)

p=0,155

III. 7. Estudio microbiológico de la bilis

El aislamiento de bacterias en bilis fue significativamente mayor en el grupo de ictericia prolongada con respecto al control de operación simulada y al grupo de tratamiento con anti-TNF- α (Tabla 19).

Tabla 19. Número total y porcentaje de cultivos positivos y negativos en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Cultivo (+)	Cultivo (-)
Operación simulada	1 (16,7%)	5 (83,3%)
IO-21 días	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Anti-TNF- α	1 (16,7%)	5 (83,3%)

p=0,016

IV. Anticuerpos anti-TNF- α vs drenaje biliar interno en la ictericia obstructiva experimental

Se compararon los dos grupos de tratamiento de este estudio, el grupo en el que se administró una dosis única de anticuerpos anti-TNF- α a los 14 días de la ligadura del conducto biliar y el grupo en el que se realizó la técnica de drenaje biliar interno tras el mismo período de obstrucción biliar.

IV. 1. Lesión hepatocelular y colestasis

La realización del drenaje biliar interno disminuyó significativamente el valor medio de la AST y ALT con respecto al grupo de administración de anticuerpos anti-TNF- α . No hubo diferencias significativas en los valores medios de FAlc y Bilirrubina en ambos grupos (Tabla 20).

Tabla 20. Valores medios de enzimas de citolisis y colestasis (media y desviación típica, IC 95%) en los grupos de administración de anti-TNF- α y drenaje biliar.

Variables	Anti-TNF- α	Drenaje biliar	p
AST (UI/L)	289,76 \pm 119,28	126,98 \pm 30,35	0,018
ALT (UI/L)	36,68 \pm 13,29	14,85 \pm 3,40	0,019
FAlc (UI/L)	142,65 \pm 76,71	96,46 \pm 19,21	0,229
Bilirrubina (mg/dL)	0,75 \pm 0,66	0,08 \pm 0,04	0,055

IV. 2. Inmunidad celular específica

La administración de anticuerpos anti-TNF- α incrementó de manera significativa los porcentajes de linfocitos T CD3 activados con respecto al grupo en el que se realizó el drenaje biliar.

Sin embargo, el drenaje biliar mejoró significativamente el porcentaje de linfocitos T CD4 activos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8 y linfocitos B activos entre los dos grupos de tratamiento (Tabla 21, figura 29).

Tabla 21. Porcentaje (media y desviación típica) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y grado de significación entre el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α y el grupo de drenaje biliar interno.

Subpoblaciones linfocitarias (% medio)	Anti-TNF- α	Drenaje biliar	p
Linfocitos T CD3/la	22,95 \pm 11,13	13,11 \pm 2,81	0,092
Linfocitos T CD4	52,80 \pm 3,92	62,51 \pm 4,65	0,013*
Linfocitos T CD8	12,57 \pm 2,43	13,21 \pm 1,62	0,638
Linfocitos B/la	6,47 \pm 4,90	5,26 \pm 0,90	0,603

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

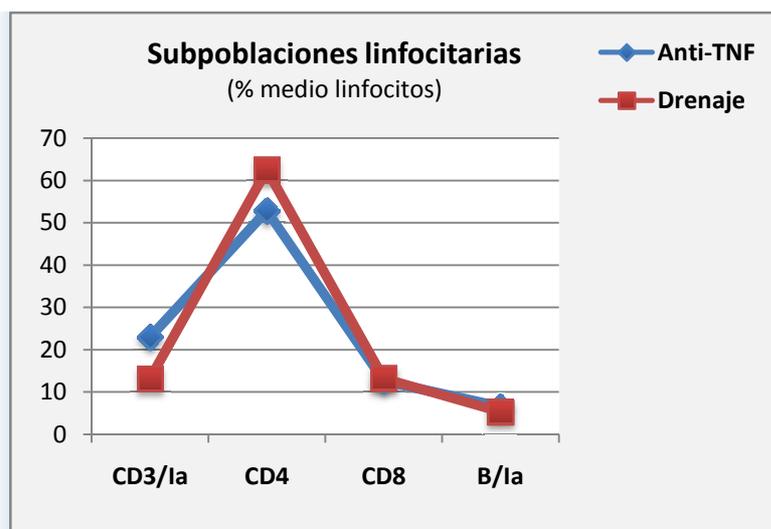


Figura 29. Porcentaje medio de las distintas subpoblaciones linfocitarias en los grupos Anti-TNF- α y Drenaje biliar.

IV. 3. Inmunidad celular inespecífica

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de Monocitos-Macrófagos CD11b, Granulocitos CD11by células NK activadas entre los grupos de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α y con drenaje biliar interno (Tabla 22, figura 30).

Tabla 22. Porcentaje de las distintas subpoblaciones celulares (media y desviación típica, IC 95%) en el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- y en el grupo de drenaje biliar interno.

Subpoblaciones celulares (% medio)	Anti-TNF- α	Drenaje biliar	p
Monocitos-Macrófagos CD11b	47,05 \pm 14,98	51,98 \pm 7,92	0,534
Granulocitos CD11b	84,06 \pm 8,60	84,81 \pm 15,81	0,928*
Células NK/Ia	2,99 \pm 0,77	3,25 \pm 0,37	0,523

La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

* Corrección modificada de Bonferroni (Hommel)

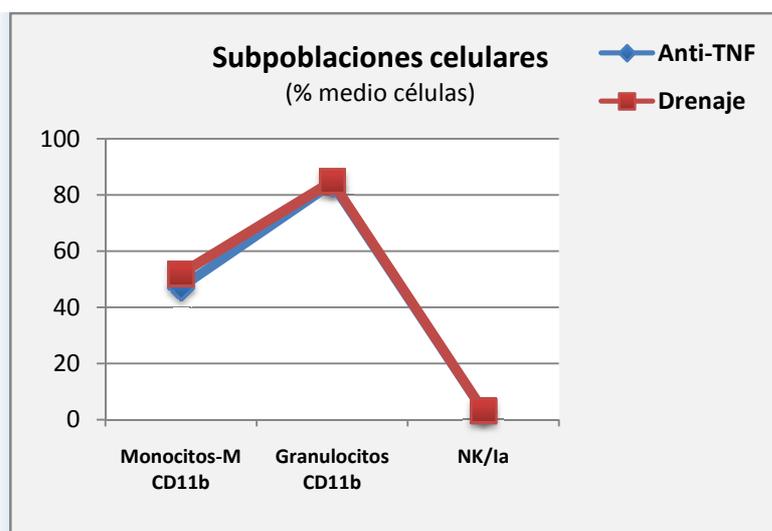


Figura 30. Subpoblaciones celulares de inmunidad inespecífica en los grupos de tratamiento con anti-TNF- α y Drenaje biliar.

IV. 4. Capacidad oxidativa y fagocítica de Neutrófilos y Macrófagos: Rodamina y Tuftsina

La capacidad oxidativa (Test de Rodamina) de los Neutrófilos y la capacidad fagocítica (Test de Tuftsina) de los Macrófagos fue significativamente mayor en el grupo en el que se realizó la técnica de drenaje biliar interno con respecto al grupo en el que se administró anti-TNF- α .

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad oxidativa de los Macrófagos ni en la capacidad fagocítica de los Neutrófilos entre ambos grupos de tratamiento (Tabla 23, figura 31).

Tabla 23. Fluorescencia (media y desviación típica) con Rodamina y Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en los grupos de tratamiento con anti-TNF- α y mediante drenaje biliar interno (IC 95%).

Capacidad oxidativa y fagocítica (% fluorescencia media)	Anti-TNF- α	Drenaje	p
Rodamina Neutrófilos	33,93 \pm 0,64	51,02 \pm 11,12	0,009
Rodamina M-Macrófagos	18,22 \pm 3,50	14,14 \pm 2,06	0,055
Tuftsina Neutrófilos	4,00 \pm 0,45	4,47 \pm 0,50	0,162
Tuftsina M-Macrófagos	4,51 \pm 2,33	9,43 \pm 4,16	0,050

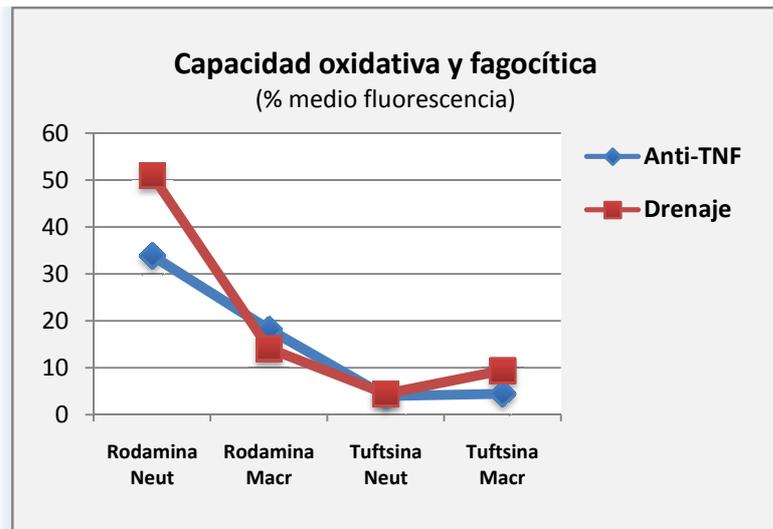


Figura 31. Fluorescencia media con Tuftsina de Neutrófilos y Macrófagos en los grupos de tratamiento con anti-TNF- α y drenaje biliar.

IV. 5. Niveles de TNF- α en sangre periférica

Cuando se compararon todos los grupos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α en los distintos grupos del trabajo (Figura 32).

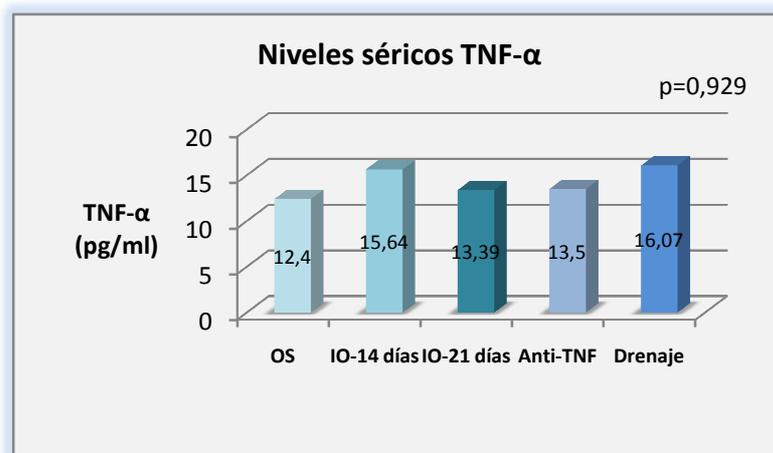


Figura 32. Niveles séricos medios de TNF- α en los distintos grupos de trabajo.

IV. 6. Niveles de endotoxinas en sangre periférica

De forma paradójica, la detección de endotoxinas en sangre periférica fue más frecuente en el grupo de Operación Simulada y en el que se administró anti-TNF- α con respecto a los grupos de ictericia y de drenaje biliar aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 24).

Tabla 24. Número total y porcentajes de detección de endotoxinas en sangre periférica en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Endotoxinas (+)	Endotoxinas (-)
Operación simulada	4 (66,7%)	2 (33,3%)
Ictericia-14 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Ictericia-21 días	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Anti-TNF- α	4 (66,7%)	2 (33,3%)
Drenaje	2 (33,3%)	4 (66,7%)

p=0,155

IV. 7. Estudio microbiológico de la bilis

En el análisis de todos los grupos, el aislamiento de bacterias en bilis fue significativamente mayor en el grupo de ictericia prolongada y en el grupo en el que se realizó el drenaje biliar interno (Tabla 25).

Tabla 25. Número total y porcentaje de cultivos positivos y negativos en los distintos grupos de trabajo.

Grupos de trabajo	Cultivo (+)	Cultivo (-)
Operación simulada	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Ictericia-14 días	4 (66,7%)	2 (33,3%)
Ictericia-21 días	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Anti-TNF- α	1 (16,7%)	5 (83,3%)
Drenaje	5 (83,3%)	1 (16,7%)

p=0,016

DISCUSIÓN

I. Análisis del método de investigación: ictericia obstructiva experimental e inmunosupresión

La ictericia obstructiva es un problema clínico frecuente y a pesar del perfeccionamiento en la técnica quirúrgica y el empleo de antibióticos de nueva generación, la cirugía en pacientes con obstrucción biliar continúa gravada con un alto índice de complicaciones infecciosas⁵². Como se ha desarrollado, estas complicaciones se han relacionado entre otros factores con la disfunción del sistema inmunitario que se produce en la ictericia.

La colestasis experimental mediante la ligadura y sección de la vía biliar principal en la rata Wistar reproduce con gran aproximación las condiciones causadas por la obstrucción biliar extrahepática en humanos, por lo que representa un instrumento de gran valor para el estudio en general de enfermedades hepáticas y de la vía biliar, y en particular como ha sido objeto de estudio en este trabajo, para el conocimiento de la alteraciones en la activación y respuesta de las células inflamatorias en situaciones de colestasis.

Nuestro estudio muestra que la ictericia obstructiva induce una significativa alteración en el número y grado de activación de las diferentes células inflamatorias. Este efecto de la colestasis podría ser el responsable del estado de inmunosupresión presente en los modelos animales de obstrucción biliar. Aunque también se ha descrito que la acumulación intrahepática de sales biliares genera la inhibición de la proliferación y de la actividad de los linfocitos T citotóxicos¹⁷.

La duración de la obstrucción biliar determinó diferencias en el grado de proliferación de las distintas subpoblaciones de linfocitos T. Se observó una disminución significativa del

porcentaje de linfocitos CD3 y linfocitos B activados en sangre periférica en el grupo de IO-21 días con respecto al de IO-14 días. En cambio los niveles de linfocitos T CD4 disminuyeron gradualmente a lo largo de los 21 días de la obstrucción biliar y los niveles de linfocitos T CD8 alcanzaron un máximo valor en el grupo de IO-14 días y sin embargo disminuyeron en el grupo de IO-21 días.

Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD4 podrían ser los responsables de la inmunosupresión inicial que acontece en la ictericia obstructiva. Sano *et col*¹⁰¹ también demostraron una disminución en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 en la lámina propia de la pared intestinal así como un incremento en la población de linfocitos T CD3 en sangre periférica una semana después de inducir la obstrucción biliar.

En un trabajo más reciente se ha demostrado que la ictericia obstructiva también inhibe la función de los linfocitos T intrahepáticos e incrementa los linfocitos T reguladores, los cuales presentan una actividad inmunosupresora sobre la población de linfocitos T hepáticos, pero al mismo tiempo presentan una actividad protectora limitando el grado de colestasis y la fibrosis en el parénquima hepático¹¹⁶.

Los niveles de monocitos-macrófagos asimismo presentaron un perfil de modificación similar al observado en los linfocitos T CD8, lo que sugiere que la ictericia obstructiva tiene efectos similares sobre ambas líneas celulares. En el análisis por citometría de flujo encontramos una disminución significativa del porcentaje medio de monocitos-macrófagos activados y del porcentaje de granulocitos CD11b activados en el grupo de IO-21 días con respecto al de IO-14 días.

La sobreestimulación de estas células en la obstrucción biliar probablemente por los fenómenos de endotoxemia y translocación bacteriana puede desencadenar efectos

adversos mediante la liberación de proteasas y radicales libres del oxígeno¹¹⁷. El incremento de la concentración de las colonias de monocitos-macrófagos activados en el suero también promueve la quimiotaxis de los granulocitos neutrófilos en la ictericia obstructiva⁷³.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de obstrucción biliar en el grado de activación de la subpoblación de linfocitos NK.

Como se comentó, en la ictericia obstructiva se pueden ver afectadas diferentes funciones de los neutrófilos como la adhesión, la emigración y quimiotaxis, y la fagocitosis y degradación intracelular de las partículas ingeridas. Nosotros encontramos una disminución de la generación de radicales libres del oxígeno y de la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos en los estadios iniciales de la colestasis. En la suboblación de macrófagos si se restableció la capacidad oxidativa en el grupo de IO-21 días, recuperando los niveles del grupo control.

El análisis de los niveles de los niveles de TNF- α en sangre periférica no mostró diferencias entre los distintos grupos estudiados. En otros modelos animales de ictericia obstructiva si se ha constatado un incremento de los niveles circulantes de TNF- α cuya principal fuente se debe a la activación de las células de Kupffer⁸⁵. Como se comentó con anterioridad, igualmente se ha descrito una disminución en los niveles de TNF- α a medida que la obstrucción biliar persiste más allá de las dos semanas y al mismo tiempo, la exposición continua a endotoxinas y la translocación bacteriana se acompañan de una tolerancia para la producción de TNF- α por las células de Kupffer^{87,88}. En nuestro estudio tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de endotoxinas en sangre periférica entre los diferentes grupos; en cambio en el análisis microbiológico de la bilis se observó un porcentaje significativamente más elevado de cultivos positivos en el grupo de ictericia prolongada.

II. Impacto del drenaje biliar interno sobre las alteraciones de la respuesta inmunológica en la ictericia obstructiva experimental

La endotoxemia y la translocación bacteriana continúan siendo un punto crítico asociado a la cirugía en pacientes con ictericia obstructiva. Como mencionamos con anterioridad, la hiperbilirrubinemia en la ictericia obstructiva se asocia a un deterioro de las funciones de defensa inmunológica del hígado y de la capacidad de aclaración de endotoxinas. Al mismo tiempo, la obstrucción biliar determina la interrupción de la circulación enterohepática de las sales biliares y la disrupción de la barrera mucosa intestinal favoreciendo el sobrecrecimiento y la translocación de bacterias hacia la circulación portal y sistémica.

Aunque continua formando parte del arsenal terapéutico en los pacientes con ictericia obstructiva, no se recomienda la realización de forma sistemática del drenaje biliar debido a las complicaciones infecciosas relacionadas con la propia técnica del drenaje, así que su utilización se recomienda de manera seleccionada ^{56, 93-95}. En el estudio microbiológico de la bilis encontramos un aislamiento de bacterias significativamente mayor con respecto a los demás grupos tanto en los animales en los que se mantuvo la ictericia durante 21 días como en aquellos en los que se realizó el drenaje biliar.

Uno de los objetivos que nos planteamos inicialmente en nuestro trabajo fue comparar dentro de un modelo experimental, el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α frente a una técnica propia de drenaje biliar interno sobre las repercusiones de la obstrucción biliar en los parámetros de lesión tisular hepática y sobre la disfunción del sistema inmunitario que acontecen en la ictericia obstructiva.

La derivación interna del conducto biliar dilatado se llevó a cabo a los 14 días de la inducción de la obstrucción biliar, lo que se acompañó de una recuperación de los niveles a los 21 días con respecto al grupo control de bilirrubina total, AST, ALT y FAlc, y esta recuperación fue mayor a la observada en el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α .

Así mismo se observó un incremento en el número de linfocitos T CD4, de los linfocitos T CD8, de los linfocitos B activados y de las células inflamatorias con actividad fagocítica, así como una expresión aumentada de marcadores celulares de activación en monocitos-macrófagos. Este incremento de marcadores de activación se relaciona con el aumento de la actividad fagocítica observada en animales con ictericia obstructiva sometidos a drenaje biliar. Sin embargo en nuestro estudio la capacidad oxidativa si fue mayor en el grupo del drenaje, pero no observamos diferencias significativas en la capacidad oxidativa de macrófagos ni en la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos aunque sí el drenaje biliar interno determinó un incremento significativo de los monocitos-macrófagos y granulocitos CD11 activados con respecto al grupo de ictericia prolongada. El porcentaje de células NK activadas también fue menor en el grupo del drenaje, sin ser en este caso tampoco la diferencia significativa.

Con respecto a la subpoblación de linfocitos CD3 activados el porcentaje fue mayor en el grupo de tratamiento, pero la diferencia tampoco fue significativa.

Probablemente los efectos beneficiosos del drenaje biliar interno se deban a esta recuperación de la capacidad de respuesta de las células inflamatorias. En otros modelos animales de obstrucción biliar el drenaje biliar también mejoró la función hepática y el estado nutricional, disminuyó la endotoxemia y la liberación de citoquinas y mejoró la inmunidad celular^{63, 75}. Todo ello se traduce en una disminución de las complicaciones sépticas y de la mortalidad tras la cirugía como comentamos anteriormente, a pesar del

porcentaje significativamente mayor de cultivos positivos en la bilis en el grupo de drenaje. En cambio, no encontramos diferencias significativas en la valoración del grado de endotoxemia entre los distintos grupos de trabajo.

III. Impacto de los anticuerpos anti-TNF sobre las alteraciones de la respuesta inmunológica en la ictericia obstructiva experimental

El TNF- α es una potente citoquina proinflamatoria y se considera uno de los principales mediadores de la respuesta del huésped frente, entre otros estímulos, las bacterias Gram negativas cuyo componente activo es el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina que deriva de la pared bacteriana. En la sepsis por bacterias Gramnegativas se pueden producir grandes cantidades de TNF- α alcanzando concentraciones que provocan la muerte en los animales de experimentación, a menos que se traten con anticuerpos anti-TNF- α ¹⁰⁵.

El TNF- α es secretado por células inflamatorias como los macrófagos y los linfocitos T. Como hemos expuesto, la neutralización de esta citoquina con anticuerpos anti-TNF- α es una estrategia terapéutica que ha sufrido un desarrollo exponencial en su aplicación en enfermedades reumatológicas y en la enfermedad inflamatoria intestinal. También se ha estudiado su efecto en la sepsis, en la hepatitis alcohólica y en modelos experimentales de ictericia obstructiva¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

El tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α mejoró los diferentes parámetros bioquímicos relacionados con la colestasis y la lesión tisular hepática con respecto al grupo control de ictericia obstructiva durante 21 días. Este resultado podría deberse a que tanto el TNF- α como la IL-6 favorecerían la hiperbilirrubinemia en situaciones de endotoxemia al afectar el flujo biliar a través de los canalículos biliares, mediante la alteración de los mecanismos de transporte celulares de las sales biliares y al incrementar la permeabilidad de las uniones intercelulares entre hepatocitos a nivel de los sinusoides como comentamos anteriormente⁹⁰.

Así mismo, en el grupo de tratamiento con anti-TNF- α se observó una recuperación en el número y grado de activación de las células inflamatorias. Los niveles de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 se recuperaron hasta valores similares al grupo control, y al mismo tiempo mejoró el número de células con actividad fagocítica en sangre periférica.

También se incrementaron los porcentajes de linfocitos TCD3 y linfocitos B activados, aunque la diferencia con el grupo control no fue significativa.. El incremento de los linfocitos T CD3 si fue mayor al observado en el grupo en el que se realizó el drenaje biliar interno.

Se observó un incremento significativo de los monocitos-macrófagos y granulocitos CD11 activados con respecto al control de IO-21 días. Sin embargo el porcentaje de células NK activadas fue menor en el grupo de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α , aunque esta diferencia no fue significativa.

Los resultados con el tratamiento mediante anticuerpos anti-TNF- α están en consonancia con los obtenidos en un modelo de lesión tisular hepática aguda inducida por D-galactosamina, en el que la lesión hepática se relaciona con la activación de los monocitos-macrófagos circulantes y la liberación de TNF- α entre otras citoquinas y a su vez se asocia con un aumento de la expresión del receptor p55 para el TNF. La administración de anticuerpos anti-TNF- α redujo en un 50% la lesión hepática y la protección por PGE1 fue dependiente de los niveles circulantes de TNF- α . También observaron un incremento en la expresión de receptores p75 en los hepatocitos por PGE1que se asocia con su actividad hepatoprotectora ¹¹⁸.

El efecto de los anticuerpos anti-TNF- α sobre el número y la expresión de marcadores celulares de activación en las células inflamatorias no se acompañó de cambios significativos

en la producción de radicales libres del oxígeno y de la actividad fagocítica asociada a la tuftsina.

Estos efectos de los anticuerpos anti-TNF- α podrían contribuir al control de la infección y reducir la morbi-mortalidad en modelos animales de ictericia obstructiva.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α en los diferentes grupos de trabajo. Sin embargo en otros modelos animales de ictericia obstructiva, si se ha constatado un incremento en los niveles circulantes de TNF- α ^{87, 88}. También como comentamos previamente se ha descrito una disminución en los niveles de TNF- α a medida que la obstrucción biliar persiste más allá de las dos semanas y al mismo tiempo, parece que la exposición continua a endotoxinas y la translocación bacteriana como sucede en la ictericia obstructiva, se acompaña de una tolerancia para la producción de TNF- α por las células de Kupffer^{87, 88}.

Probablemente el grado de unión a sus receptores específicos sea uno de los factores responsables de las diferencias encontradas en los distintos trabajos en los niveles séricos de TNF- α libre.

En resumen, la ictericia obstructiva experimental se acompaña de las alteraciones metabólicas propias de un modelo de colestasis y también se asoció a un deterioro de la respuesta inmunitaria celular, en términos de proliferación y activación de monocitos-macrófagos y de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8. Tanto el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α como la realización del drenaje biliar interno mejoraron los diferentes parámetros bioquímicos de colestasis y lesión tisular hepática inducidos por la ictericia obstructiva, aunque el drenaje biliar interno tuvo un impacto más potente en este sentido que la administración de anticuerpos anti-TNF- α . Ambos

tratamientos mejoraron la capacidad de respuesta inmunológica de linfocitos T CD4 y T CD8 así como de los monocitos-macrófagos. Los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-TNF- α podrían plantear otra perspectiva sobre el uso de la terapia biológica durante la obstrucción biliar, aunque serían necesarios más estudios para validar nuestros resultados y establecer una selección meticulosa de qué grupo de pacientes con ictericia obstructiva se podría beneficiar de la aplicación de esta terapia.

CONCLUSIONES

- 1.- La ictericia obstructiva experimental se asoció a una disminución en el grado de proliferación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias que expresan la inmunidad específica, tanto en los linfocitos T como en los linfocitos B.
- 2.- De igual forma, la ictericia obstructiva también se asoció a una disminución de la activación de monocitos-macrófagos y de la capacidad oxidativa y fagocítica de neutrófilos y macrófagos en los estadios iniciales de la colestasis.
- 3.- El tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α se asoció a una mayor respuesta de la inmunidad específica, expresada en los linfocitos T CD3 y T CD4, sin determinar cambios relevantes en las otras subpoblaciones.
- 4.- La administración de anticuerpos anti-TNF- α se asoció a un incremento en el número de granulocitos CD11b, si bien la capacidad oxidativa y fagocítica global de granulocitos y macrófagos no se vio mejorada.
- 5.- Cuando se compararon los efectos de los anticuerpos anti-TNF- α con los del drenaje biliar, este último mejoró la respuesta de los linfocitos T CD4, si bien la respuesta en las otras subpoblaciones linfocitarias fue similar en los dos grupos de tratamiento.
- 6.- En el estudio comparativo de la inmunidad inespecífica, el drenaje biliar además de incrementar el número de granulocitos y monocitos-macrófagos, mejoró la funcionalidad respecto al tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fawcett D.W. Tratado de Histología. 11ª Edición. Interamericana. McGraw-Hill 1991; 27: 683-696.
2. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III-XIII, 1-151.
3. Knolle P. A, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunological Reviews* 2000; 174: 21-34.
4. Manual de Robbins. Patología Estructural y funcional. S. L. Robbins, R. S. Cotran. V. Kumar. Interamericana. McGraw-Hill 1992; 2: 27-28.
5. Clements W.D.B., McCaigue M., Erwin P., Halliday I., Rowlands B.J. Biliary decompression promotes Kupffer cell recovery in obstructive jaundice. *Gut* 1996; 38: 925-931.
6. Tomioka M, Iinuma H, Okinaga K. Impaired Kupffer Cell Function and Effect of Immunotherapy in Obstructive Jaundice. *J Surg Res* 2000; 92: 276-282.
7. Clements W.D.B., Halliday M.I., McCaigue M.D. Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. *Arch Surg* 1993; 128: 200-205.
8. Kennedy J.A., Lewis H., Clements W.D.B., Kirk S.J., Campbell G., Halliday M.I., Rowlands B.J. Kupffer cell blockade, tumour necrosis factor secretion and survival following endotoxin challenge in experimental biliary obstruction. *Br J Surg* 1999; 86: 1410-1414.
9. Lázár G., Paszt A., Kaszaki J., Duda E., Szakács J., Tiszlavicz L., Boros M., Balogh Á., Lázár G. Kupffer cell phagocytosis blockade decreases morbidity in endotoxemic rats with obstructive jaundice. *Inflamm Res* 2002; 51: 511-518.
10. Kennedy J.A., Clements W.D.B., Kirk S.J., McCaigue M.D., Campbell G.R., Erwin P.J., Halliday M.I., Rowlands B.J. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. *Br J Surg* 1999; 86: 628-633.
11. Roland C.R, Goss J.A, Mangino M.J, Hafenrichter D, Wayne Flye M. Autoregulation by Eicosanoids of Human Kupffer Cell Secretory Products. A Study of Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- β , and Nitric Oxide. *Annals of Surgery* 1994; 219: 389-399.
12. Gregory S. H, Wing E. J. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukocyte Biology* 2002; 72: 239-248.

13. Gregory S. H, Cousens L. P, van Rooijen N, Döpp E. A, Carlos T. M, Wing E. J. Complementary Adhesion Molecules Promote Neutrophil-Kupffer Cell Interaction and the Elimination of Bacteria Taken Up by the Liver. *J Immunology* 2002; 168: 308-315.
14. Parker G. A, Picut C. A. Liver Immunobiology. *Toxicologic Pathology* 2005; 33: 52-62.
15. Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, Hiraide H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag⁺ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological Reviews* 2000; 174: 35-46.
16. Racanelli V. Rehermann B. The Liver as Immunological Organ. *Hepatology* 2006; 43: S54-S62.
17. Nehéz L., Andersson R. Compromise of Immune function in obstructive jaundice. *Eur J Surg* 2002; 168: 315-328.
18. O'Neil S., Hunt J., Filkins J., Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997; 122: 281-287.
19. Bemelmans M.H.A., Gouma D.J., Greve J.W., Buurman W.A. Effect of antitumour necrosis factor treatment on circulating tumour necrosis factor levels and mortality after surgery in jaundiced mice. *Br J Surg* 1993; 80: 1055-1058.
20. van der Poll T., Levi M., van Deventer S.J.H., Cate H., Haagmans B.L., Biemond B.J., Büller H.R., Hack C.E., Cate J.W. Differential effects of ant-Tumor Necrosis Factor Monoclonal Antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood* 1994; 83: 446-451.
21. Shattuck K.E., Grinnell C.D., Goldman A.S., Rassin D.K. The acute effects of TNF- α on the isolated perfused rat liver. *J Invest Med* 1996; 44: 64-69.
22. Androlewicz M.J., Browning J.L., Ware C.F. Lymphotoxin is expressed as a heteromeric complex with a distinct 33 kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J Biol Chem* 1992; 267: 2542-2547.
23. Lechner A.J., Velasquez A., Knudsen K.R., Johanns C.A., Tracy T.F., Matuschak G.M. Cholestatic liver injury increases circulating TNF- α and IL-6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1550-1558.
24. Gérard C., Bruyns C., Marchant A. Interleukin 10 reduces the release of tumour necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1991; 173: 547-550.
25. Inoue Y., Bode B.P., Souba W.W. Antibody to tumor necrosis factor attenuates endotoxin-stimulated amino acid transport in rat liver. *Surgery* 1994; 116: 356-366.

26. Engelman H., Novick D., Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine: evidence for immunological cross reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 1990; 265: 1531-1536.
27. Bemelmans M.H.A., Greve J.W.M., Gouma D.J., Buurman W.A. Increased concentrations of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in biliary obstruction in mice; soluble TNF receptors as prognostic factors for mortality. *Gut* 1996; 38: 447-453.
28. van Zee K.J., Kohno T., Fischner E., Rock C.S., Moldawer L.L., Lowry S.F. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in vitro* and *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci* 1992; 89: 4845-4849.
29. Bemelmans M.H.A., Gouma D.J., Buurman W.A. LPS induced sTNFr-receptor release *in vivo* in a murine model: investigation of the rol of TNF, IL-1, LIF and IFN γ . *J Immunol* 1993; 151: 5554-62.
30. Bemelmans M.H.A., Gouma D.J., Buurman W.A. Tissue distribution and clearance of soluble murine TNF receptors in mice. *Cytokine* 1994; 6: 609-615.
31. Kimura F., Miyazaki M., Suwa T., Sugiura T., Shinoda T., Itoh H., Nagakawa K., Ambiru S., Shimizu H., Yoshitome H. Anti-inflammatory response in patients with obstructive jaundice by biliary malignancy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 467-472.
32. Ballinger A.B., Woolley J.A., Ahmed M., Mulcahy H., Alstead E.M., Landon J., Clark M.L., Farthing M.J.G. Persistent systemic inflammatory response after stent insertion in patients with malignant bile duct obstruction. *Gut* 1998; 42: 555-559.
33. Doherty D.G, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological Reviews* 2000; 174: 5-20.
34. Nakatani K., Kaneda K., Seki S., Nakajima Y. Pit cells as liver associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 29-36.
35. Wiltout R.H. Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. *Immunol Rev* 2000; 174: 63-76.
36. Hirazawa K., Hazama S., Oka M. Depressed cytotoxic activity of hepatic nonparenchymal cells in rats with obstructive jaundice. *Surgery* 1999; 126: 900-907.
37. Bourlioux P., Koletzko B., Guarner F., Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 675-683.
38. Acheson D.W., Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2004; 18: 387-404.

39. Farhadi A., Banan A., Fields J., Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 479-497.
40. Baumgart D.C., Dignass A.U. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 685-694.
41. Dial E.J., Romero J.J., Villa X., Mercer D.W., Lichtenberger L.M. Lipopolysaccharide-induced gastrointestinal injury in rats: role of surface hydrophobicity and bile salts. *Shock* 2002; 17: 77-80.
42. Clements W.D.B., Parks R., Erwin P., Halliday M.I., Barr J., Rowlands B.J. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996; 39: 587-593.
43. Mammen J.M., Matthews J.B. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit CareMed* 2003; 31: 532-537.
44. Parks R.W., Clements W.D.B., Smye M.G., Pope C., Rowlands B.J., Diamond T. Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal by internal biliary drainage. *B J Surg* 1996; 83: 1345-1349.
45. Fink M.P. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 143-151.
46. Slocum M.M., Sitting K.M., Specian R.D., Deitch E.A. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992; 58: 305-310.
47. Otte J.M., Kiehne K., Herzig K.H. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol* 2003; 38: 717-726.
48. Sung J.Y., Costerton J.W., Shaffer E.A. Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Dig Dis Sci* 1992; 37 (5): 689-96.
49. Ding J.W., Andersson R., Soltesz V., Willen R., Bengmark S. The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993; 25: 11-19.
50. Hofmann A.F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2647-2658.
51. Scott-Conner C.E., Grogan J.B. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. *J Surg Res* 1994; 57 (2): 316-336.
52. Kimmings A.N., van Deventer S.J.H., Obertop H., Rauws E.A.J., Gouma D.J. Inflammatory and immunologic effects of obstructive jaundice: pathogenesis and treatment. *J Am Coll Surg* 1995; 181:567-581.

53. Sheen-Chen S.M., Chen H.S., Ho H.T., Chen W.J., Sheen C.C., Eng H.L. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced Tumor Necrosis Factor- α production in obstructive jaundice. *World J Surg* 2002; 26:448-450.
54. Stephen P. Povoski, Martin S. Karpeh, Jr., Kevin C. Conlon, Leslie H. Blumgart, Murray F. Brennan. Association of Preoperative Biliary Drainage with Postoperative Outcome Following Pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1999; 230: 131-142.
55. Mansfield S.D., Sen G., Oppong K, Jacques B.C., O'Suilleabhain C.B., Manas D.M., Charnley R.M. Increase in serum bilirubin levels in obstructive jaundice secondary to pancreatic and periampullary malignancy implications for timing of resectional surgery and use of biliary drainage. *HBP* 2006; 8: 442-445.
56. Fang Y., Gurusamy K.S., Wang Q., Davidson B.R., Lin H., Xie X., Wang C. Pre-operative biliary drainage for obstructive jaundice. *Cochrane Database Sys Rev* 2012; Sep 12; 9.
57. Palma P., Mihaljevic N., Hasenberg T., Keese M., Koepfel T.A. Intestinal barrier dysfunction in developing liver cirrhosis: An in vivo analysis of bacterial translocation. *Hepatol Res* 2007; 37:6-12.
58. Su C.H., P'eng F.K., Lui W.Y. Factors affecting morbidity and mortality in biliary tract surgery. *World J Surg* 1992; 16: 536-540.
59. Deitch E. A., Sitting K., Li M., Berg R. Specian R.D. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990; 159: 79-84.
60. Deitch E.A. Gut-Origin sepsis; evolution of a concept. *Surgeon* 2012; December 10(6):350-356.
61. Greve J.W., Maessen J.G., Tiebosch T. *et al.* Prevention of postoperative complications in jaundiced rats. *Ann Surg* 1991; 212:221-7.
62. Kimmings A.N., van Deventer S.J.H., Obertop H., Rauws E.A.J., Huibregtse K., Gouma D.J. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000; 46:725-731.
63. Padillo F.J., Muntane J., Montero J.L., Briceño J., Miño G., Solórzano G., Sitges-Serra A., Pera-Madrado C. Effect of internal biliary drainage on plasma levels of endotoxin, Cytoquines, and C-reactive Protein in patients with obstructive jaundice. *World J Surg* 2002; 26: 1328-1332.

64. Gong J.P., Wu C.X., Liu C.A., Li S.W., Shi Y.J. Yang K., Li Y., Li X.H. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 923-927.
65. Parks R.W., Halliday M.I., McCrory D.C., Erwin P., Smye M., Diamond T., Rowlands B.J. Host immune responses and intestinal permeability in patients with jaundice. *B J Surg* 2003; 90: 239-245.
66. McCullough L.K., Takahashi Y., Le T., Pittman Q.J., Swain M.G. Attenuated febrile response to lipopolysaccharide in rats with biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 172-177.
67. Kordzaya D.J., Goderdzishvili V.T. Bacterial translocation in Obstructive Jaundice in rats: Role of Mucosal Lacteals. *Eur J Surg* 2000; 166: 367-374.
68. Hoshino S., Sun Z., Uchikura K., Tsugane K., Ceppa E., Bulkley G.B., Klein A.S. Biliary Obstruction Reduces Hepatic Killing and Phagocytic Clearance of Circulating Microorganisms in Rats. *J Gastrointest Surg* 2003;7:497-506.
69. Ding J.W., Andersson R., Norgren L. Effect of biliary decompression on reticuloendothelial function in jaundiced rats. *Br J Surg* 1992;79:648-652.
70. Sheen-Chen S.M., Phuonglan Chau B.S., Ho H.T., Harris H.W. Obstructive Jaundice alters Kupffer Cell Function Independent of Bacterial Translocation. *J Surg Research* 1998;80:205-209.
71. Abe T., Arai T., Ogawa A., Hiromatsu T., Masuda A., Matsuguchi T., Nimura Y., Yoshikai Y. Kupffer Cell-Derived Interleukin 10 Is Responsible for Impaired Bacterial Clearance in Bile Duct-Ligated Mice. *Hepatology* 2004;40:414-423.
72. Caglikulekci M., Besirv E., Özkan H., Gündogdu H., Bakanay S.M. The Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on the Immune Parameters in Experimental Obstructive Jaundice. *Hepato-Gastroenterology* 2001;48:220-223.
73. Takaoka M., Kubota Y., Tsuji K., Yamamoto S., Ogura M., Yanagitani K., Shimatani M., Shibatani N., Inoue K. Human Neutrophil Functions in Obstructive Jaundice. *Hepato-Gastroenterology* 2001;48:71-75.
74. Analay H., Cantürk N.Z., Yildirir C., Cantürk Z. Effects of Vitamin E on Neutrophil Phagocytosis During Experimental Ostructive Jaundice. *Hepato-Gastroenterology* 2000;47:355-358.
75. Tsuji K., Kubota Y., Yamamoto S. Increased neutrophil chemotaxis in obstructive jaundice: An in vitro experiment in rats. *J Gastroentorol Hepatol* 1999;14:457-463.

76. Pinto M., Kaplun A. Immune status in mice with experimental biliary obstruction. *Clin Immunol and Immunopathology* 1980; 16:396-405.
77. Thompson R.L.E., Hoper M., Diamond T., Rowlands B.J. Development and reversibility of T Lymphocyte dysfunction in experimental obstructive jaundice. *Br J Surg* 1990;77:1229-1232.
78. Ueno K., Ajiki T., Watanabe H., Abo T., Takeyama Y., Onoyama H., Kuroda Y. Changes in Extrathymic T Cells in the Liver and Intestinal Intraepithelium in Mice with Obstructive Jaundice. *World J Surg* 2004;28:277-282.
79. Greve J.W.M., Gouma D.J., Soeters P.B., Buurman W.A. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: A study with germ free rats. *Gastroenterology* 1990; 98:478-485.
80. Li H., Xiong S.T., Zhang S.X., Liu S.B., Luo Y. Immunological status of patients with obstructive jaundice and immunostimulatory effect of arginine. *J Tongji Med Univ* 1993; 13:111-115.
81. Bowen D.G., McCaughan G.W., Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends in Immunol* 2005; 26:512-517.
82. Bertolino P., Bowen D.G., McCaughan G.W., Fazekas D.G.B. Antigen-specific primary ctivation of CD8⁺ T cells within the liver. *J Immunol* 2001; 166: 5430-5438.
83. Warren A., Le Couteur D.G., Fraser R., Bowen D.G., McCaughan G.W., Bertolino P. T Lymphocytes Interact With Hepatocytes Through Fenestrations in Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Hepatology* 2006; 44:1182-1190.
84. Peschon J.J., Torrance D.S., Stocking K.L., Glaccum M.B., Otten C., Willis C.R., Charrier K., Morrissey P.J., Ware C.B., Mohler K.M. TNF Receptor-Deficient Mice Reveal Divergent Roles for p55 and p75 in Several Models of Inflammation. *J of Immunol* 1998; 160:943-952.
85. Badger S.A., Jones C., McCaigue M., Clements B.W., Parks R.W., Diamond T., McCallion K., Taylor M.A. Cytokine response to portal endotoxaemia and neutrophil stimulation in obstructive jaundice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24:25-32.
86. Beierle E.A., Vauthey J.N., Moldawer L.L., Copeland E.M. Hepatic tumor necrosis factor-alpha production and distant organ dysfunction in a murine model of obstructive jaundice. *Am J Surg* 1996; 171:201-206.
87. Dawiskiba J., Kornafel P., Kwiatkowska D. and Zimecki M. Alterations of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 production and activity of the reticuloendothelial system in experimental obstructive jaundice in rats. *HPB* 2002; 4:11-20.

88. Reynolds J.V., Murchan P., Redmond H.P., Watson R.W.G., Leonard N., Hill A., Clarke P., Marks P., Keane F.B.V., Tanner W.A. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br J Surg* 1995; 82:534-538.
89. Evans T.J., Moyes D., Carpenter A., Martin R., Loetscher H., Lesslauer W., Cohen J. Protective Effect of 55- but not 75-kD Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor-Immunoglobulin G Fusion Proteins in an Animal Model of Gram-negative Sepsis. *J Exp Med* 1994; 180:2173-2179.
90. Ikeda S., Mitaka T., Harada K., Sato F., Mochizuki Y., Hirata K. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 reduce bile canalicular contractions of rat hepatocytes. *Surgery* 2003; 133:101-109.
91. van der Gaag N.A., Kloek J.J., M de Castro S.M., Busch O.R., van Gulik T.M., Gouma D.J. Preoperative Biliary Drainage in Patients with Obstructive Jaundice: History and Current Status. *J Gastrointest Surg* 2009; 13:814-820.
92. Wang Q., Gurusamy K.S., Lin H., Xie X., Wang C. Preoperative biliary drainage for obstructive jaundice. *Cochrane Database Sys Rev* 2008; 3; Jan.
93. Tol J.A., Busch O.R., van der Gaag N.A., van Gulik T.M., Gouma D.J. The quandary of preresection biliary drainage for pancreatic cancer. *Cancer J* 2012; 18:550-554.
94. de Bellis M., Palaia R., Sandomenico C., Di Girolamo E., Cascella M., Fiore F. Is preoperative endoscopic biliary drainage indicated for jaundiced patients with resectable pancreatic cancer? *Curr Drug Targets* 2012; 13:753-63.
95. Van Heek N.T., Busch O.R., van Gulik T.M., Gouma D.J. Preoperative biliary drainage for pancreatic cancer. *Minerva Med* 2014; 105:99-107.
96. Park S.Y., Park C.H., Cho S.B., Lee W.S., Kim J.C., Cho C.K., Joo Y.E., Kim H.S., Choi S.K., Rew J.S. What is Appropriate Procedure for Preoperative Biliary Drainage in Patients With Obstructive Jaundice Awaiting Pancreaticoduodenectomy? *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2011; 21:344-348.
97. Fukouka K., Ajiki T., Miyazawa M., Takeyama Y., Onoyama H., Kuroda Y. Changes in the Number of Gut Mucosal T-lymphocytes and Macrophages in Patients Treated by External Biliary Drainage. *Eur J Surg* 2001; 167:684-688.
98. Suzuki H., Iyomasa S., Nimura Y., Yoshida S. Internal Biliary Drainage, Unlike External Drainage, Does not Suppress the Regeneration of Cholestatic Rat Liver After Partial Hepatectomy. *Hepatology* 1994; 20:1318-1322.

99. Saiki S., Chijiwa K., Komura M., Yamaguchi K., Kuroki S., Tanaka M. Preoperative Internal Biliary Drainage Is Superior to External Biliary Drainage in Liver Regeneration and Function After Hepatectomy in Obstructive Jaundiced Rats. *Annals of Surg* 1999; 230:655-662.
100. Mok K.T., Wang B.W., Chang H.C., Lin S.L. External Biliary Drainage plus Bile Acid Feeding Is Not Equal to Internal Drainage in Preserving the Cellular Immunity Following Prolonged Obstructive Jaundice. *Digest Dis Sciences* 2001; 46:1864-1870.
101. Sano T., Ajiki T., Takeyama Y., Kuroda Y. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression in jaundiced rats. *Surgery* 2004; 136:693-699.
102. Meng Y., Gong Y.C., Dou Y., Li W. Changes of serum cytokines and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA by Kupffer cells after relief from obstructive jaundice in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:1064-1069.
103. Okaya T., Nakagawa K., Kimura F., Shimizu H., Yoshidome H., Ohtsuka M., Kato A., Yoshitomi H., Ito H., Miyazaki M. The alterations in hepatic microcirculation and Kupffer cell activity after biliary drainage in jaundiced mice. *J Hepatobiliary Pancreatic Sci* 2012; 19:397-404.
104. van Horssen R., Ten Hagen T.L., Eggermont A.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 2006; 11:397-408.
105. Celada A. Inmunología básica. 1ª Edición. Editorial Labor 1994; 26:435-445.
106. Kawalec P., Mikrut A., Wisniewska N., Pilc A. Tumor necrosis factor- α antibodies (infliximab, adalimumab, certolizumab) in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* 2013; 9:765-769.
107. Altwegg R., Vincent T. TNF Blocking Therapies and Immunomonitoring in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm* 2014; 7 pages.
108. Lv S., Han M., Yi R., Kwon S., Dai C., Wang R. Anti-TNF- α t
109. Therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract* 2014; 68:520-528.
110. Hill D.B., McClain C.J. Anti TNF therapy in alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 261

111. Roberts N.J., Zhou S., Diaz L.A., Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* 2011; 2:739-751.
112. Benucci M., Saviola G., Manfredi M., Sarzi-Puttini P., Atzeni F. Tumor necrosis factor blocking agents: analogies and differences. *Acta Biomed* 2012; 83: 72-80.
113. Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S., Tsukamoto H., Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatol* 2010; 49:1215-1228.
114. Qiu Z., Wang A., Zheng C., Zhou S., Li L. Protective effect of anti-TNF- α monoclonal antibody against myocardial injury secondary to acute obstructive jaundice in rats. *Chinese J General Surg* 2012; 2.
115. Arias J., Lorente L., Aller M.A., Rodríguez J., Alonso M.S., Trobo J.I. Durán H. Cirugía hepática experimental. Editorial Kronos. Zaragoza 1993; 53-60.
116. Lee E. The effect of obstructive jaundice on the migration of reticulo-endothelial cells and fibroblasts into early experimental granulomata. *Br J Surg* 1972; 59:875-878.
117. Katz S.C., Ryan K., Ahmed N., Plitas G., Chaudhry U.I., Kingham T.P., Naheed S., Nguyen C., Somasundar P., Espat N.J., Junghans R.P., De Matteo R.P. Obstructive Jaundice Expands Intrahepatic Regulatory T Cells, Which Impair Liver T Lymphocyte Function but Modulate Liver Cholestasis and Fibrosis. *J Immunol* 2011; 187:1150-1156.
118. Padillo F.J., Cruz A., Navarrete I., Bujalance J., Briceño J., Gallardo J.I., Marchal T., Caballero R., Túnez I., Muntané J., Montilla P., Pera-Madrado C. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Radic* 2004; 38:697.
119. Lozano J.M., Padillo F.J., Montero J.L., Peña J., de la Mata M., Muntané J. Immunomodulatory activity of TNF- α during acute liver injury by D-galactosamina and its protection by PGE1 in rats. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:197-207.