

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LA ESTIMULACION
DE LOS LINFOCITOS T
SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE
SECUNDARIAS A LA OBSTRUCCION BILIAR**

Trabajo presentado por el Licenciado
Peter Vorwald Kuborn
para optar al Grado de Doctor en Medicina

Directores: Dr. Fernando Baquero Mochales
Dr. Angel Celdrán Uriarte

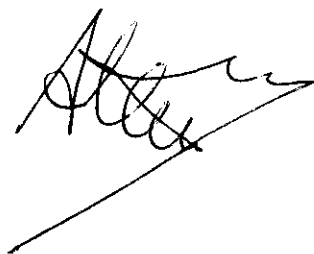
Madrid, noviembre de 1995

D. FERNANDO BAQUERO MOCHALES, DOCTOR EN MEDICINA Y JEFE DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGIA DEL HOSPITAL RAMON Y CAJAL DE MADRID, Y D. ANGEL CELDRAN URIARTE, DOCTOR EN MEDICINA Y ADJUNTO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DEL HOSPITAL LA PAZ DE MADRID.

CERTIFICAN: Que el trabajo presentado por Peter Vorwald Kuborn, titulado EFECTO DE LA ESTIMULACION DE LOS LINFOCITOS T SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE SECUNDARIAS A LA OBSTRUCCION BILIAR, ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Con tal condición podemos acreditar que esta investigación reúne las características de originalidad y rigor científico que son exigibles para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Madrid, noviembre de mil noveciento noventa y cinco

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel Celdran Uriarte', with a long horizontal line extending from the bottom of the signature.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Baquero Mochales', with a horizontal line underneath.

Este proyecto de investigación ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (expediente número 90/0603) y Laboratorios Serono.

A mi mujer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Angel Celdrán, por su dirección, paciencia y continuo estímulo científico y personal.

Al Dr. Fernando Baquero, por su dirección y valiosos consejos.

Al Dr. Javier Fernández, por su ayuda en la determinación de endotoxinas.

A la Dra. Susana Alemany, por su colaboración en el estudio de la proliferación linfocitaria.

Al Dr. Julio Maset, por su asesoramiento en el diseño experimental y el análisis estadístico de los datos.

Al Dr. Angel de la Calle, por su estímulo y ayuda a la hora de iniciarme en la Cirugía Experimental.

Al Prof. Enrique Moreno, por su ejemplo, apoyo y confianza.

Al Dr. Pablo Jorge, por sus consejos en el trabajo de Cirugía Experimental.

A D. Antonio Carrasco y D. Martín García, por su colaboración en el diseño gráfico.

A las Dras. Marta de Vega y Nieves Palacios, por su paciencia y comprensión.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION

1.1. BASES MORFOLOGICAS Y FISIOLOGICAS DE LA SECRECION BILIAR

- 1.1.1. ANATOMIA FUNCIONAL DEL SISTEMA SECRETOR BILIAR.
- 1.1.2. FISIOLOGIA DE LA SECRECION BILIAR.
 - 1.1.2.1. Aspectos generales.
 - 1.1.2.2. Secreción de sales biliares.
 - 1.1.2.3. Secreción de lípidos biliares y otros solutos orgánicos.
- 1.1.3. ACCION DE LA BILIS EN LOS PROCESOS DE DIGESTION Y ABSORCION INTESTINAL. CIRCULACION ENTEROHEPATICA.

1.2. SISTEMA INMUNE

- 1.2.1. CONCEPTO DE SISTEMA INMUNE.
- 1.2.2. MOLECULAS DEL SISTEMA INMUNE.
 - 1.2.2.1. Sistema del complemento.
 - 1.2.2.2. Inmunoglobulinas.
 - 1.2.2.3. Linfocinas y monocinas.
 - 1.2.2.4. Sistema principal de histocompatibilidad.
- 1.2.3. CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.
 - 1.2.3.1. Sistema mononuclear-fagocítico.
 - 1.2.3.2. Las células de Kupffer como principal componente del SMNF.
 - 1.2.3.3. Linfocitos T.
 - 1.2.3.4. Linfocitos B.
 - 1.2.3.5. Células citotóxicas espontáneas.
- 1.2.4. DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE.
 - 1.2.4.1. Aspectos generales.
 - 1.2.4.2. Activación de los linfocitos T.
 - 1.2.4.3. Activación de los linfocitos B.
 - 1.2.4.4. Activación de las células citotóxicas espontáneas.
 - 1.2.4.5. Activación del sistema del complemento.

1.3. LA BARRERA MUCOSA INTESTINAL COMO ELEMENTO DEL SISTEMA INMUNE

- 1.3.1. ASPECTOS GENERALES.
- 1.3.2. ESTRUCTURA HISTOLOGICA.
- 1.3.3. MECANISMOS DE DEFENSA ESPECIFICA.
- 1.3.4. MECANISMOS DE DEFENSA INESPECIFICA.

1.4. ENDOTOXINAS BACTERIANAS

- 1.4.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.
- 1.4.2. BASES MOLECULARES DE LAS ENDOTOXINAS.
 - 1.4.2.1. Aspectos generales.
 - 1.4.2.2. Antígeno-O.
 - 1.4.2.3. Antígeno “core”.
 - 1.4.2.4. Lípido A.
- 1.4.3. INTERACCION ENTRE ENDOTOXINA Y HUESPED.
 - 1.4.3.1. Absorción de endotoxinas.
 - 1.4.3.2. Aclaramiento de endotoxinas.
 - 1.4.3.2.1. Aspectos generales.
 - 1.4.3.2.2. Participación de las células de Kupffer en el aclaramiento de endotoxinas.
 - 1.4.3.3. Mediadores de la respuesta biológica a las endotoxinas.
 - 1.4.3.3.1. Aspectos generales.
 - 1.4.3.3.2. Activación del complemento.
 - 1.4.3.3.3. Activación de los macrófagos.
 - 1.4.3.3.4. Activación de la coagulación.
 - 1.4.3.4. Alteraciones producidas por la acción de las endotoxinas en los distintos órganos y sistemas.
 - 1.4.3.4.1. Alteraciones hemodinámicas.
 - 1.4.3.4.2. Alteraciones del parénquima hepático.
 - 1.4.3.4.3. Otras alteraciones producidas por la endotoxina.

1.5. FISIOPATOLOGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR

1.5.1. ASPECTOS GENERALES.

1.5.2. ALTERACIONES DEL SISTEMA HEPATICO.

1.5.2.1. Cambios morfológicos en hígado y sistema excretor biliar.

1.5.2.2. Alteraciones de la hemodinámica hepática.

1.5.2.3. Alteraciones de la secreción biliar.

1.5.2.4. Alteraciones de la función hepatocelular.

1.5.2.4.1. Alteraciones de la síntesis proteica.

1.5.2.4.2. Alteraciones de la circulación enterohepática de los ácidos biliares.

1.5.2.4.3. Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina.

1.5.2.4.4. Otras alteraciones metabólicas.

1.5.3. ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN LA OBSTRUCCION BILIAR.

1.5.3.1. Translocación de bacterias y endotoxinas como consecuencia de las alteraciones de la barrera mucosa intestinal.

1.5.3.2. Alteraciones del sistema mononuclear fagocítico.

1.5.3.3. Alteraciones de linfocitos y neutrófilos.

1.5.4. REPERCUSION DE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN EL ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINAS.

1.6. COMPLICACIONES PERIOPERATORIAS DE LA CIRUGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR RELACIONADAS CON LA ENDOTOXINA

1.6.1. ASPECTOS GENERALES.

1.6.2. ALTERACIONES DE LA FUNCION RENAL.

1.6.3. HEMORRAGIA GASTROINTESTINAL.

1.6.4. ALTERACIONES DE LA CICATRIZACION.

1.6.5. COMPLICACIONES INFECCIOSAS.

1.7. EFECTO DE LA TERAPIA ADYUVANTE PARA LA RECUPERACION PREOPERATORIA DEL SISTEMA INMUNE EN LA CIRUGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR

1.7.1. DRENAJE BILIAR PREOPERATORIO.

1.7.2. SALES BILIARES.

1.7.3. LACTULOSA.

1.7.4. POLIMIXINA.

1.7.5. INMUNOMODULACION.

1.7.5.1. Aspectos generales

1.7.5.2. Las hormonas tímicas como agentes inmunomoduladores.

1.7.5.3. Características de la timoestimulina.

1.7.5.3.1. Aspectos generales.

1.7.5.3.2. Mecanismos de acción y valoración de su actividad.

1.7.5.3.3. Farmacodinamia y toxicidad.

1.7.5.3.4. La timoestimulina en experimentación animal.

1.7.5.3.5. La timoestimulina en ensayos clínicos.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. ANIMALES.

3.1.2. REACTIVOS

3.1.2.1. Determinaciones bioquímicas en sangre.

3.1.2.2. Estudio de la proliferación linfocitaria.

3.1.2.3. Determinación de endotoxinas.

3.1.2.4. Anestésicos.

3.1.2.5. Otros.

- 3.1.3. INMUNOMODULADOR.
- 3.1.4. APARATOS Y MATERIAL FUNGIBLE.
 - 3.1.4.1. Determinaciones bioquímicas en sangre.
 - 3.1.4.2. Estudio de la función linfocitaria.
 - 3.1.4.3. Determinación de endotoxinas.
 - 3.1.4.4. Instrumental quirúrgico.
 - 3.1.4.5. Otros.
- 3.1.5. MATERIAL PARA ESTUDIO ESTADISTICO.

3.2. METODOS

- 3.2.1. MANEJO DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION
 - 3.2.1.1. Cuidados generales.
 - 3.2.1.2. Técnica anestésica.
 - 3.2.1.3. Técnica quirúrgica para interrumpir el flujo biliar.
 - 3.2.1.4. Técnica para la obtención de muestras de sangre.
 - 3.2.1.4.a. Sangre sistémica.
 - 3.2.1.4.b. Sangre portal.
 - 3.2.1.5. Técnica de esplenectomía para estudio de función linfocitaria.
 - 3.2.1.6. Técnica para estudio de aclaramiento de endotoxina.
- 3.2.2. DETERMINACION DE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN SANGRE.
- 3.2.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA MITOGENICA A CONCAVALINA A DE LINFOCITOS T DEL BAZO.
 - 3.2.3.1. Aislamiento de linfocitos del bazo.
 - 3.2.3.2. Medida de la proliferación celular.
- 3.2.4. TEST DEL LAL (LYMULUS AMOEBOCYTE LYSATE) PARA LA DETERMINACION DE ENDOTOXINA.
 - 3.2.4.1. Fundamentos del test del LAL.
 - 3.2.4.2. Procesamiento de muestras de sangre para el ensayo LAL.
 - 3.2.4.3. Determinación de endotoxina.
- 3.2.5. ESTUDIO DEL ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINAS.
- 3.2.6. ADMINISTRACION DEL INMUNOMODULADOR.

3.2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.2.8. METODO ESTADISTICO.

3.2.8.1. Recepción de casos.

3.2.8.2. Depuración.

3.2.8.3. Estadística descriptiva.

3.2.8.4. Estudio de distribución.

3.2.8.5. Estadística analítica.

3.2.8.5.a. Análisis intragrupo.

3.2.8.5.b. Análisis intergrupo.

IV. RESULTADOS

4.1. ALTERACIONES PONDERALES

4.2. ALTERACIONES DE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS HEPATICOS

4.2.1. GRUPO CONTROL.

4.2.2. GRUPO BLANCO.

4.2.3. GRUPO ICTERICO.

4.2.4. GRUPO TERAPEUTICO.

4.3 ALTERACIONES DE LAS CIFRAS DE CREATININA EN SANGRE

4.3.1. GRUPO CONTROL.

4.3.2. GRUPO BLANCO.

4.3.3. GRUPO ICTERICO.

4.3.4. GRUPO TERAPEUTICO.

4.4. RESPUESTA DE LINFOCITOS T A CONCANAVALINA A

4.4.1. GRUPO CONTROL.

4.4.2. GRUPO BLANCO.

4.4.3. GRUPO ICTERICO.

4.4.4. GRUPO TERAPEUTICO.

4.5. NIVELES DE ENDOTOXEMIA PORTAL

4.5.1. GRUPO CONTROL.

4.5.2. GRUPO BLANCO.

4.5.3. GRUPO ICTERICO.

4.5.4. GRUPO TERAPEUTICO.

4.6. NIVELES DE ENDOTOXEMIA SISTEMICA

4.6.1. GRUPO CONTROL.

4.6.2. GRUPO BLANCO.

4.6.3. GRUPO ICTERICO.

4.6.4. GRUPO TERAPEUTICO.

4.7. ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINA

4.7.1. GRUPO CONTROL.

4.7.2. GRUPO ICTERICO.

4.7.3. GRUPO TERAPEUTICO.

V. DISCUSION

VI. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

1.1. BASES MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA SECRECIÓN BILIAR.

1.1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL DEL SISTEMA SECRETOR BILIAR.

La secreción biliar tiene básicamente dos funciones, la excreción de metabolitos procedentes de sustancias endógenas y exógenas (bilirrubina, drogas, etc.) y la de elementos necesarios para la digestión y absorción de lípidos. El 90% de la bilis es agua y el 10% restante está constituido por electrolitos y solutos orgánicos como ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol y bilirrubina conjugada.

Los hepatocitos están dispuestos en hileras monocelulares bañada por la sangre sinusoidal. Su membrana plasmática presenta tres áreas distintas desde el punto de vista morfológico y funcional: una sinusoidal, que abarca el 37%, separada por el espacio de Disse de las células endoteliales fenestradas de los sinusoides; otra lateral (50%), en contacto con los hepatocitos adyacentes; y la canalicular (13%), que con la de uno o dos hepatocitos vecinos forma el canalículo biliar.

La cara basolateral o sinusoidal esta activamente implicada en el transporte de sustancias que llegan al espacio de Disse atravesando el endotelio sinusoidal. En este espacio se encuentran ubicadas las células de Kupffer que, como se expondrá posteriormente, son macrófagos pertenecientes al sistema mononuclear-fagocítico.

En la cara lateral o intercelular, en contacto con la del hepatocito vecino, se establece la adhesión y comunicación entre ambas células y se delimita la vía de transporte paracelular. Su zona más próxima a la cara canalicular presenta tres áreas de contacto que constituyen el complejo de unión intercelular. Las uniones estrechas o “zónula ocludens” son las más cercanas al canalículo biliar, al cual aíslan del espacio sinusoidal. A través de ellas es posible el paso de agua, electrolitos y algunos solutos orgánicos de mayor peso molecular. Los desmosomas en cinturón o “zónula adherens” se encuentran algo más cerca de la pared sinusoidal y sirven de anclaje a los microfilamentos pericanaliculares, y por ello mantienen a los hepatocitos unidos. Los desmosomas en botón o “mácula adherens” son el lugar de anclaje de tonofilamentos citoplasmáticos.

El canalículo biliar posee estructuras pseudodiverticulares y microvellosidades que hacen que la superficie canalicular alcance unos diez metros cuadrados en el hombre. En él comienza el sistema colector biliar y se continúa con el canal de Hering, delimitado por uno o dos hepatocitos en un lado y una o dos células ductales en el otro. Estas estructuras son difíciles de identificar en exámenes histológicos rutinarios a no ser que estén ocupados por tapones de bilis como ocurre en la ictericia obstructiva. Los canales de Hering desembocan en los ductulos que están tapizados por células de revestimiento pobremente diferenciadas y desembocan, a su vez, en los conductos biliares interlobulillares recubiertos por epitelio cuboidal o columnar bajo; estos en los conductos septales y, finalmente, en los lobulares (318).

1.1.2. FISILOGIA DE LA SECRECION BILIAR.

1.1.2.1. Aspectos generales.

La secreción biliar se lleva a cabo por un mecanismo denominado de “ultrafiltración osmótica”, que se basa en establecer un gradiente osmótico entre la luz del canalículo y la sangre sinusoidal. Para que este gradiente se produzca es necesario que sustancias con poder osmótico, fundamentalmente sales biliares, sean transportadas desde el sinusoides, a través de los hepatocitos, hasta el canalículo. Una vez que estas se encuentran en el canalículo biliar se produce el paso secundario de agua, debido al gradiente osmótico, a través de la vía paracelular.

El flujo diario de bilis en el hombre es de 600 ml, de los cuales, 450 ml corresponden a la secreción de los hepatocitos o bilis *primaria*, *hepatocitaria* o *fracción canalicular*, y 150 ml a la secreción de las células ductulares o *fracción ductular*. Estas últimas sólo segregan agua y electrolitos por lo que más que producir bilis propiamente dicha, modifican su volumen y concentración (318).

1.1.2.2. Secreción de sales biliares y electrolitos.

Las sales biliares son responsables del flujo biliar dependiente. Para que este se lleve a cabo es necesario que aquellas sean captadas por el hepatocito, transportadas a través de su citoplasma y segregadas en el canalículo biliar. Estos procesos

requieren un transporte activo que consume energía, ya que la concentración sinusoidal de sales biliares es de 5 a 20 μM y la canalicular de 2 a 3 mM. Una vez en el canalículo, las sales biliares atraen agua gracias a su capacidad colerética, que oscila entre 7 y 10 $\mu\text{l}/\mu\text{M}$, aunque las sales biliares divalentes conjugadas con sulfato pueden alcanzar 25 $\mu\text{l}/\mu\text{M}$ (116).

1.1.2.3. Secreción de lípidos biliares y otros solutos orgánicos.

La bilis contiene colesterol y fosfolípidos, sobre todo lecitina. A diferencia de los fosfolípidos biliares, sólo el 30% del colesterol biliar procede de la síntesis hepática; el resto de la ingesta. El colesterol es solubilizado en forma de micelas por los ácidos biliares y fosfolípidos. Además de los anteriores, a través de la bilis se excretan bilirrubina conjugada, drogas, colorantes y hormonas. Cualquiera de estas sustancias que tenga poder oncótico contribuye a formar el flujo biliar independiente de sales biliares (318).

1.1.3. ACCION DE LA BILIS EN LOS PROCESOS DE DIGESTION Y ABSORCION INTESTINAL.

CIRCULACION ENTEROHEPATICA.

Los ácidos biliares desempeñan un papel esencial en la digestión y absorción intestinal de lípidos de la dieta. Emulsionan las grasas aumentando así la superficie de acción de la lipasa pancreática. Después de la digestión se forman micelas mixtas de colesterol, fosfolípidos, ácido grasos, ácidos biliares y monoglicéridos. De esta forma, es posible que moléculas lipídicas poco solubles puedan atravesar la capa acuosa adyacente de la membrana plasmática del enterocito y ser absorbidas.

Los ácidos biliares primarios, cólico y quenodesoxicólico, son sintetizados en el hígado a partir de colesterol y los secundarios, desoxicólico y litocólico, derivan de los primarios por la acción de las bacterias, principalmente del colon. Casi todos los ácidos biliares son segregados por el hígado conjugados a glicina o taurina; esto hace descender su pK, por lo que en la luz intestinal suelen estar ionizados y son hidrosolubles. Las bacterias intestinales hidrolizan la unión amida de la glicina

o taurina con el ácido biliar, desconjugándolo y haciéndolo liposoluble, por lo que pueden atravesar membranas y establecerse la circulación enterohepática.

La mayor parte (70-80%) de la reabsorción de ácidos biliares tiene lugar mediante transporte activo dependiente de Na^+ en los 100 ó 150 cm distales de íleon; el resto, que corresponde a ácidos no conjugados, suele absorberse de forma pasiva. La bilirrubina no es absorbida y pasa prácticamente intacta del intestino delgado al colon, es desconjugada por β -glucuronidasas bacterianas y da lugar a los urobilinógenos que, tras ser oxidados, colorean las heces (318).

1.2. SISTEMA INMUNE

1.2.1. CONCEPTO DE SISTEMA INMUNE.

Se puede definir como aquel sistema encargado de diferenciar lo propio de lo extraño. Está constituido por un conjunto de células y moléculas cuya característica principal es la capacidad para el reconocimiento de fragmentos moleculares de elementos extraños que pueden penetrar en el organismo. Existe una respuesta inmune “no específica” o “natural”, desarrollada a nivel de diversas barreras defensivas, y una “específica” o “adquirida” que se caracteriza por la interacción entre el elemento antigénico reconocido como extraño y el sistema inmune, generándose una memoria inmunológica específica para el antígeno. Entre ambas existe una estrecha interrelación (14) (54) (221) (255).

El componente celular del sistema inmune lo constituyen linfocitos T y B, células natural killer o células citotóxicas naturales y el sistema mononuclear-fagocítico. La base molecular esta formada por el sistema del complemento, las inmunoglobulinas y las citocinas (182).

1.2.2. MOLECULAS DEL SISTEMA INMUNE.

1.2.2.1. Sistema del complemento.

Es un conjunto de proteínas séricas sintetizadas, fundamentalmente en el hígado, que se activan de forma secuencial, por lo que también reciben el nombre de cascada del complemento. Como se verá posteriormente, los productos resultantes de su activación ejercen diversos efectos biológicos como la lisis de membranas celulares, el estímulo de la quimiotaxis y fagocitosis, y otros fenómenos de la reacción inflamatoria (255).

1.2.2.2. Inmunoglobulinas.

Son moléculas segregadas por las células plasmáticas procedentes de la diferenciación y maduración del clon de linfocitos B activado por un antígeno determinado y con capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno. Están constituidas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas entre sí por puentes de sul-

furo, con regiones constantes y regiones variables que determinan la especificidad de unión al antígeno. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: Ig G, Ig A, Ig M, Ig D e Ig E. (1) (14).

1.2.2.3. Linfocinas y monocinas.

Se trata de moléculas cuya característica fundamental es la de no ser antígeno-específicas. Reciben el nombre genérico de citocinas, y se denomina linfocinas a las segregadas por los linfocitos y monocinas a las producidas por monocitos. Cuando las citocinas transmiten mensajes de un leucocito a otro, o sobre la misma célula que las produce, reciben el nombre de interleucinas. Como se expondrá a continuación, intervienen en los procesos de activación del sistema inmune, pero ni su síntesis ni sus efectos son exclusivos de este ya que pueden regular la función de otros órganos y tejidos (1) (53).

1.2.2.4. Sistema principal de histocompatibilidad.

Son moléculas de carácter antigénico que diferencian a los miembros de una misma especie. El gen que las determina se localiza en el cromosoma 6. Tienen una estructura glicoproteica y se expresan en la membrana citoplásmica de células con núcleo. Participan en los procesos de reconocimiento antigénico y activación de los componentes celulares del sistema inmune. Hay dos tipos de moléculas de histocompatibilidad, clase I y clase II, según la región génica que las codifique (12).

1.2.3. CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.

1.2.3.1. Sistema mononuclear-fagocítico (SMNF).

También conocido como sistema retículo-endotelial, agrupa a las células accesorias del sistema inmune, diferentes morfológicamente, pero que en su membrana expresan moléculas de clase I y clase II del sistema principal de histocompatibilidad y receptores para Ig G y componentes activados del complemento. Su función básica es captar el antígeno, procesarlo y presentarlo a los linfocitos para su activación (Figura 1). En él se incluyen los monocitos circulantes y una serie

de macrófagos distribuidos por distintos órganos y sistemas como las células de Kupffer del hígado, las células dendríticas del tejido conectivo y ganglionar, las células de Langerhans de la piel, etc. (1) (31) (316).

1.2.3.2. Las células de Kupffer como principal componente del SMNF.

Estas células desarrollan el 80-90 % de la capacidad fagocitaria del SMNF y representan el 50 % de las células parenquimatosas hepáticas. Se localizan en los espacios de Disse, entre el endotelio del sinusoides y los hepatocitos, constituyendo el “complejo perisinusoidal”. Por su localización, son una de las primeras barreras con las que se encuentran los antígenos absorbidos en el tubo digestivo. Se pueden considerar un filtro o “barrendero (scavenger)” de todo lo que llega al hígado por vía portal. En condiciones normales, el aclaramiento de los antígenos portales se completa con un solo paso. Este aclaramiento depende de que el flujo sanguíneo sea el adecuado.

La vida media de las células de Kupffer en el hígado es de 12 días. Cuando en circunstancias anómalas son destruidas, otras células del “complejo perisinusoidal”, como las endoteliales y los hepatocitos, pueden incrementar su capacidad fagocitaria (30) (44) (46) (65) (71) (87) (124) (357) (366).

1.2.3.3. Linfocitos T.

Representan el 70-80% de los linfocitos circulantes y reciben su denominación por la *maduración intratímica durante la vida fetal y postnatal precoz*. Expresan en su membrana diversas moléculas que, por su estructura y función sirven, para identificarlos y clasificarlos; se denominan con las siglas “CD” (cluster of differentiation). Estas moléculas actúan fundamentalmente en el reconocimiento antigénico así como en la activación y adherencia celular. Parte de ellas tienen carácter polimórfico, con una región variable que corresponde al clon de linfocitos que se activará con un determinado antígeno; son receptores antigénicos que están constituidos por el heterodímero alfa - beta (α - β) o gamma - delta (γ - δ). Estos receptores se unen por enlaces no covalentes al complejo molecular monomórfico o

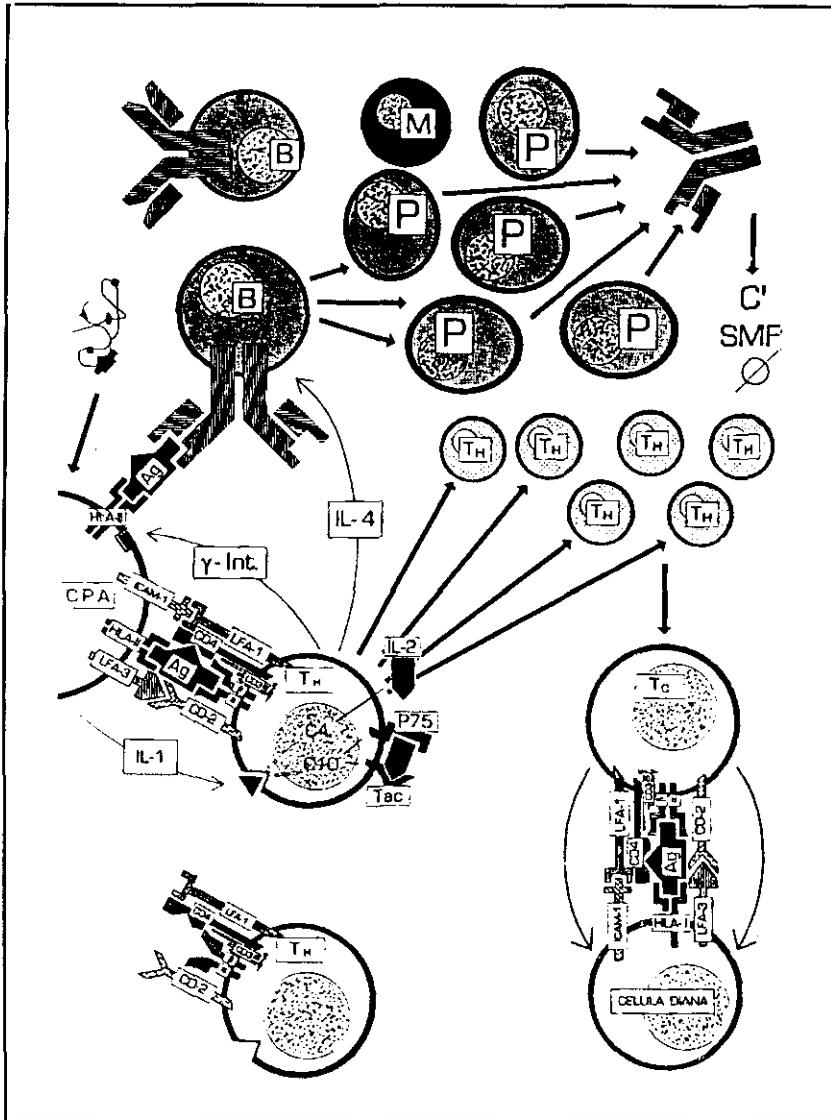


FIGURA 1. Activación de los componentes celulares del sistema inmune (11).

constante CD 3, el cual participa en la transducción de la señal de activación celular una vez que se ha producido el reconocimiento y unión específica al antígeno (Figura 1).

Otras moléculas, igual que el CD 3, son monomórficas y por tanto idénticas en los distintos clones de linfocitos. Entre ellas está el CD 2 ó receptor de los hematíes de carnero que, al ser complementaria con LFA-3 (Lymphocyte function-associated antigen) de la célula presentadora de antígeno, actúa como anclaje para estabilizar la unión entre esta y el linfocito T. Las moléculas CD 4 y CD 8 se expresan de forma excluyente y definen dos poblaciones de linfocitos fenotípicamente diferentes. En general, los linfocitos que expresan el CD 4 tienen una función cooperadora o “helper” y los que expresan el CD 8, citotóxica o supresora. El CD 4 se une a determinantes no polimórficos de la molécula HLA II de la célula presentadora de antígeno, y el CD 8 a los de la molécula HLA I presente en la célula diana. La molécula LFA-1 es complementaria de ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) en la célula presentadora de antígeno o en la célula diana (Figura 1) (11) (12) (181) (182).

1.2.3.4. Linfocitos B.

Reciben esta denominación por su maduración en la bolsa de Fabricio de las aves o en su equivalente de la médula ósea en los mamíferos. Morfológicamente son similares a los linfocitos T, pero se diferencian por expresar en su membrana inmunoglobulinas de superficie que actúan como receptor antigénico. Las inmunoglobulinas presentan dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas entre sí; cada una de ellas tiene una porción constante y una porción variable. Esta última es diferente para los distintos clones de linfocitos B. Cuando se produce el proceso de activación y maduración de los linfocitos B, estos se diferencian hacia células plasmáticas capaces de segregar inmunoglobulinas (Figura 1) (11) (12) (182).

1.2.3.5. Células citotóxicas espontáneas.

Constituyen una subpoblación de linfocitos que morfológicamente se caracteriza por su núcleo arriñonado y los gránulos azurófilos de su citoplasma. En su mem-

brana expresan moléculas monomórficas como CD 16, receptor del fragmento Fc de la Ig G, CD 56 y, de forma variable, CD 2 y CD 8. Pueden tener actividad lítica sobre células tumorales e infectadas por virus sin que se requiera una fase de sensibilización previa y sin estar restringidas por las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad. También pueden ejercer funciones reguladoras sobre otras subpoblaciones de linfocitos y células hematopoyéticas (Figura 1) (11).

1.2.4. DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE.

1.2.4.1. Aspectos generales.

La respuesta inmune es un proceso por el cual, tras la exposición al antígeno, se activan aquellos clones de linfocitos, T ó B, que tienen en su superficie el receptor clonotípico o la inmunoglobulina capaz de reconocerlo. Inicialmente, la respuesta inmune es específica, pero los procesos posteriores que regulan la progresión de la activación linfocitaria son inespecíficos y compartidos por distintos antígenos. Después de ser expuestos al antígeno, el clon de linfocitos activado pasa de la fase de reposo del ciclo celular, o fase Go, a otra más activa. La activación de los linfocitos T y B tiene aspectos comunes y otros diferentes (Figura 1) (11).

1.2.4.2. Activación de los linfocitos T.

La activación de las células T se produce de forma secuencial (Figura 1). En la primera fase o de inducción, después de ser procesado el antígeno por la célula accesoria, es expuesto en su membrana en presencia de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad. De esta forma se puede producir el contacto con el receptor antigénico del linfocito T cooperador. La célula accesoria segrega interleucina-1 (IL-1), que actúa sobre su receptor en la membrana del linfocito. Al mismo tiempo, el acoplamiento entre las distintas moléculas de la superficie de ambas células pone en marcha una serie de procesos intracelulares en el linfocito T, que terminan con la activación de diferentes genes y la síntesis proteica propia de la fase G1 precoz del ciclo celular (11) (66).

Después de la fase de inducción, el clon de linfocitos T activado pasa a la fase de expansión, aumentando masivamente la expresión de receptores para IL-2 (IL-2r). Simultáneamente, la IL-2 segregada al medio actúa sobre la población de linfocitos que expresan IL-2r; el complejo formado se internaliza en la célula y se pasa a la fase G1 tardía del ciclo celular. En este proceso pueden intervenir otras linfocinas como el interferón γ , la IL-4 y las hormonas tímicas. De esta forma termina produciéndose la proliferación del clon de linfocitos correspondiente al antígeno. Esta proliferación de linfocitos T conlleva la síntesis de diversas linfocinas que van a regular la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, las células citotóxicas espontáneas y las células T citotóxicas (11).

1.2.4.3. Activación de los linfocitos B.

La activación de los linfocitos B se produce después de entrar en contacto con el antígeno y con la colaboración de los linfocitos T cooperadores. En determinadas condiciones biológicas o en el caso de algunas subpoblaciones, el linfocito B se puede activar sin que se requiera la presencia de los linfocitos T. De la misma forma que el linfocito T, esta activación es secuencial (Figura 1).

La unión del linfocito B y el antígeno se lleva a cabo por medio de las inmunoglobulinas que aquel expresa en su superficie. Cabe la posibilidad de que después de la unión se produzca un proceso de endocitosis del complejo antígeno-inmunoglobulina y el linfocito B actúe como célula presentadora de antígenos.

Para que el clon de linfocitos B progrese en el ciclo celular y prolifere, se necesita el estímulo de citocinas, parte de ellas procedentes del linfocito T cooperador, como IL-1, IL-2, IL-4, interferón γ y el factor de necrosis tumoral. Alguna, como el factor transformante del crecimiento beta, tiene un efecto inhibitorio. En ciertas condiciones de activación, hay subpoblaciones de linfocitos B que pueden llegar a segregar linfocinas para regular de forma autocrina su proliferación.

Los linfocitos B activados maduran hacia células plasmáticas con capacidad de

segregar inmunoglobulinas a través de un proceso poco conocido. Entre las citocinas que parecen regular esta maduración de los linfocitos B se encuentran la IL-1, IL-2, IL-4, factor de necrosis tumoral y la linfoxina (12).

1.2.4.4. Activación de las células citotóxicas espontáneas.

La activación del linfocito T citotóxico se inicia por la interacción de su receptor clonotípico con el antígeno en presencia de moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad. Cualquier célula que presente esta molécula en su membrana puede presentar el antígeno. El proceso de activación, una vez iniciado, es similar al del linfocito T cooperador. En la activación de estas células parece que participan citocinas como la IL-2, IL-1 y el factor de necrosis tumoral. Las hormonas tínicas podrían aumentar la actividad citotóxica de las mismas. Los linfocitos T citotóxicos activados pueden unirse a las células que expresan en su membrana el antígeno y provocar su muerte (Figura 1) (11).

1.2.4.5. Activación del sistema del complemento.

Se ha comentado que el complemento engloba una serie de proteínas séricas, ligadas a membranas celulares, que se activan secuencialmente por procesos proteolíticos (Figura 2). Está constituido, a su vez, por dos sistemas que convergen en su proceso de activación: la vía clásica, activada por complejos antígeno-anticuerpo (Ig G ó Ig M), y la vía alternativa, activada directamente por moléculas presentes en la superficie bacteriana. La convergencia de las dos se produce a nivel del factor C3, y terminan formando el complejo de ataque a la membrana que produce la lisis celular. Otras funciones del complemento son la opsonización, producida por fragmentos u opsoninas procedentes de la lisis del factor C3, y el estímulo de otros fenómenos inflamatorios por los fragmentos C3a y C5a, procedentes de los factores C3 y C5 o anafilotoxinas (12).

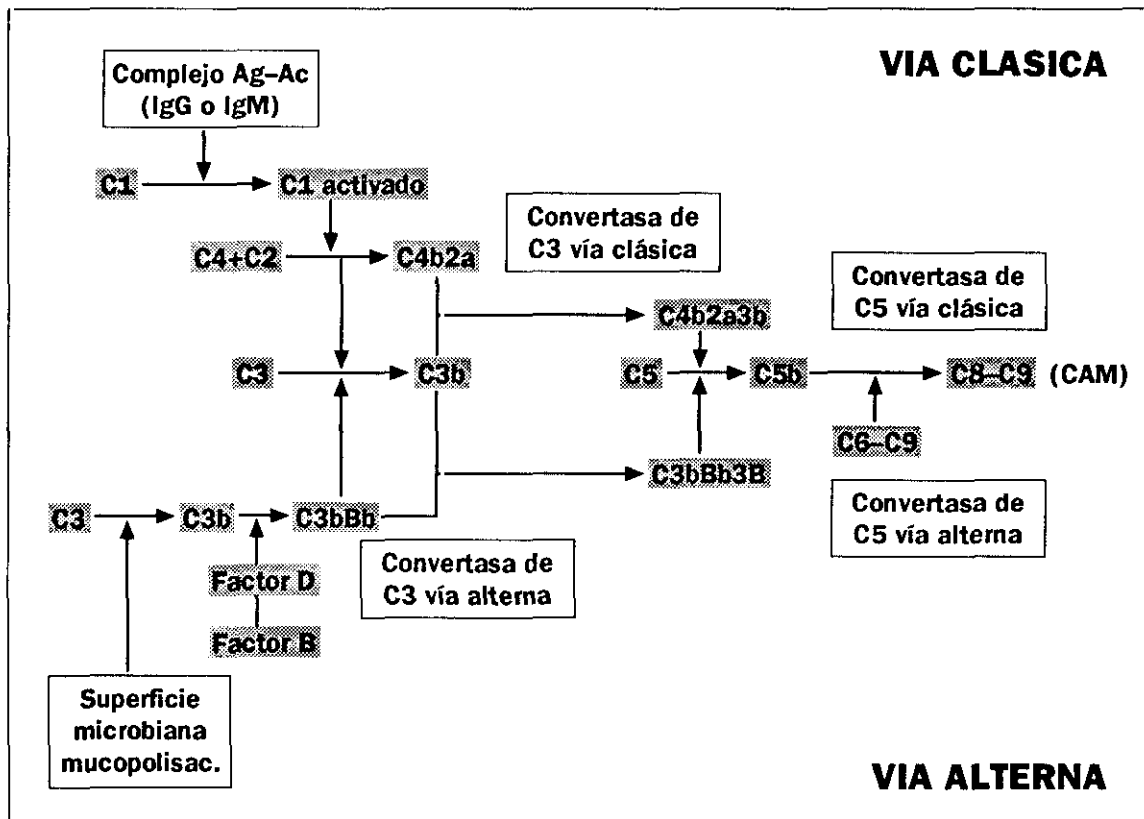


FIGURA 2. Proceso de activación del complemento (12).

1.3. LA BARRERA MUCOSA INTESTINAL COMO ELEMENTO DEL SISTEMA INMUNE

1.3.1. ASPECTOS GENERALES.

La presencia de bacterias en el tubo digestivo, imprescindible para los procesos de digestión y absorción de nutrientes, es posible gracias a un perfecto equilibrio con el huésped. Este equilibrio es mantenido por la acción de la barrera mucosa intestinal, en torno a la cual se desarrollan una serie de mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, gran parte de los cuales constituyen lo que Alverdy et al (16) han denominado “función inmune intestinal”.

1.3.2. ESTRUCTURA HISTOLOGICA.

En la pared del intestino, especialmente del delgado, existen elementos que contribuyen, de forma específica o inespecífica, a la “función inmune intestinal”, manteniendo el equilibrio de la flora intraluminal y controlando su translocación. Las vellosidades intestinales están cubiertas por una capa de moco que evita la adherencia directa de las bacterias a los enterocitos. Los complejos de unión entre estos últimos impiden el paso de bacterias y de otras partículas, y entre ellos aparecen células secretoras de moco, leucocitos y células del sistema APUD. En las criptas de Lieberkühn se encuentran las células de Paneth, que contienen lisozima y pueden fagocitar y digerir microorganismos de la flora intestinal. El epitelio intestinal se renueva constantemente; las células se originan en el fondo de las criptas y emigran hacia el vértice de las vellosidades donde se desprenden dejando una zona de extrusión, a través de la cual cabe la posibilidad de que penetren las bacterias.

Las células epiteliales descansan sobre una membrana basal que también contribuye a impedir el paso de bacterias. Por debajo de esta se encuentran la lámina propia constituida por un tejido conjuntivo laxo ricamente vascularizado en el que existen fibrocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos, células cebadas, linfocitos y células indiferenciadas. Algunas de estas células, como se verá posteriormente, contribuyen al desarrollo de la inmunidad específica intestinal. El

tejido linfoide intestinal se denomina GALT (gut associated lymphoid tissue) y representa el 50% del tejido linfoide del organismo (128) (376) (377).

1.3.3. MECANISMOS DE DEFENSA ESPECIFICA.

Están representados fundamentalmente por la Ig-A secretora (Ig A-S) que es la inmunoglobulina más abundante en secreciones externas. La estructura de la Ig A-S puede ser considerada única entre las inmunoglobulinas, pues se presenta como una glicoproteína constituida por dos moléculas de Ig A, unidas por una cadena en J, y un componente secretor (Figura 3). Esta estructura le confiere resistencia a los enzimas digestivos y a cambios de temperatura y pH. Parece que su mecanismo de acción se basa en inhibir la adherencia de bacterias a las células de la mucosa intestinal, que es el primer paso para la translocación.

El proceso de producción de la Ig A-S comienza a nivel de las placas de Peyer, situadas en la lámina propia del íleon y constituidas por agregados de linfocitos B, linfocitos T y macrófagos (Figura 4). En la cúpula de las placas de Peyer existen células epiteliales especializadas o células M que procesan el antígeno hacia el macrófago, iniciándose así la activación y proliferación de los linfocitos B con la colaboración de linfocitos T. Una vez activados, son conducidos por vía linfática a la circulación sistémica, que los distribuye de nuevo por la lámina propia del intestino y de otras mucosas. Aquí maduran a células plasmáticas que producen la Ig A-S, que es transportada a la luz intestinal por endocitosis inversa (Figura 5) (17).

La producción diaria de Ig A-S varía según los distintos tejidos y especies. En el hombre, la mayor parte de la Ig A-S procede de la secreción intestinal, y en roedores, de la secreción biliar (225).

1.3.4. MECANISMOS DE DEFENSA INESPECIFICA.

El tubo digestivo proximal contiene pocos microorganismos debido a la acción de las secreciones gástrica y biliar. Estudios experimentales, "in vitro" e "in vivo", han demostrado un efecto inhibitorio de las sales biliares sobre bacterias anaero-

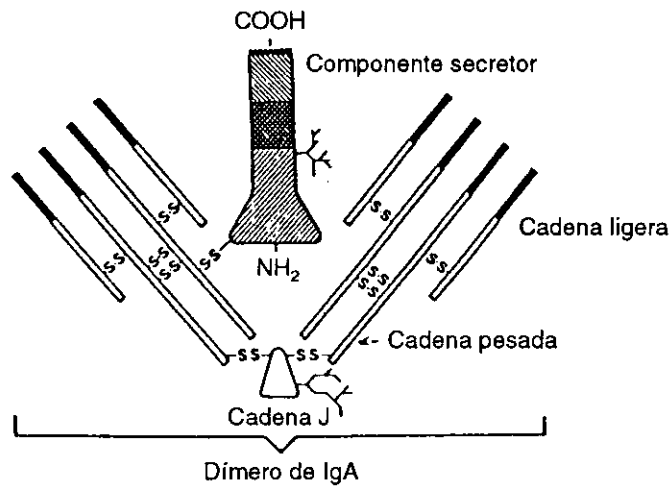


FIGURA 3. Estructura de la IgA secretora (17).

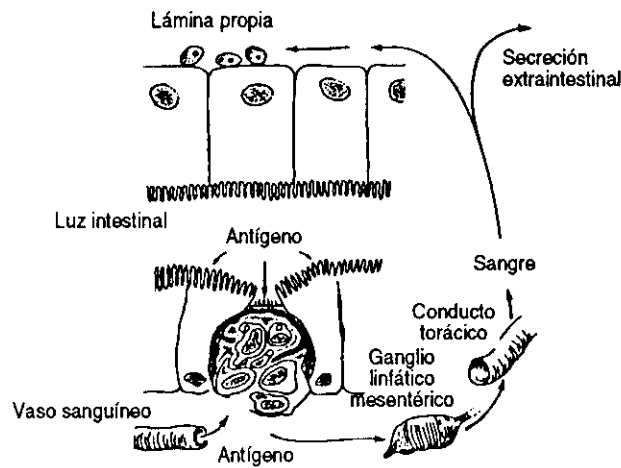


FIGURA 4. Proceso de síntesis y secreción de IgA-S (17).

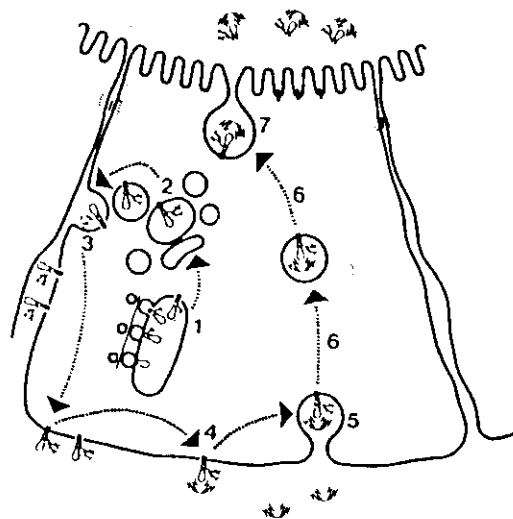


FIGURA 5. El transporte de IgA-S desde la membrana basal al borde secretor de las células secretoras se realiza, tras su unión a receptores del componente secretor, por un proceso de pinocitosis inversa (17).

bias. Se ha observado que las secreciones biliar y pancreática tienen un efecto trófico sobre la mucosa intestinal, lo cual puede contribuir a mantener la barrera. Otros factores limitantes del crecimiento bacteriano en el intestino delgado son la propia motilidad intestinal y la válvula íleo-cecal. Finalmente, las bacterias anaerobias pueden formar una pasta en la superficie mucosa que bloquea los receptores epiteliales para adhesinas de bacterias gram negativas (13) (43) (57) (126) (215) (279) (280) (333) (376) (380).

1.4. ENDOTOXINAS BACTERIANAS

1.4.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El descubrimiento de las endotoxinas se produjo a finales del siglo XIX cuando Richard Pfeiffer (citado en 238 y 299), discípulo de Robert Koch, observó que lisados de *Vibrio cholerae* inactivados por calor contenían un principio tóxico que era capaz de causar la muerte en animales de experimentación. A esta toxina, termoestable, se le dio el nombre de “endotoxina” para distinguirla de la “exotoxina”, termolábil, segregada activamente por bacterias vivas. Más tarde, Centanni (citado en 238 y 299) vio que la endotoxina se podía aislar a partir de bacterias gram negativas pero no de bacterias gram positivas, y además tenía propiedades pirógenas. Buchner (citado en 238 y 299) fue el primero en asociar endotoxinas con leucocitosis y otras alteraciones de la inmunidad del huésped. En 1935, Boivin y Messrobeanu (citados en 238 y 299) demostraron que la actividad endotóxica de bacterias gram negativas reside en un complejo macromolecular de la membrana externa. Veinte años después, Westphal y Lüderitz (citados en 28) describieron la estructura bioquímica de las endotoxinas.

1.4.2. BASES MOLECULARES DE LAS ENDOTOXINAS.

1.4.2.1. Aspectos generales.

La pared de las bacterias gram negativas está constituida por una membrana citoplásmica interna, el péptidoglicano, una membrana externa y, en muchos casos, por estructuras adicionales como cápsulas, polisacáridos extracelulares, fimbrias y flagelos. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa que forman una barrera hidrófoba e impiden la entrada de sales biliares, enzimas y ciertos antibióticos; de esta forma la bacteria también puede eludir los mecanismos defensivos del huésped. Las endotoxinas son liberadas por bacterias gram negativas vivas, en fase de multiplicación, y muertas. La endotoxina “libre” es una fracción de la total o “celular”, pero es la que tiene importancia patogénica para el hombre y los animales. Está formada por un componente lipídico o “lípidio A” unido a un polisacárido que, a su vez, se divide

en dos zonas, el polisacárido central o “core” y el polisacárido “antígeno O” (Figura 6).(28) (239) (301)

1.4.2.2. Antígeno O.

Es la porción más externa de la endotoxina y está formada por un número variable de unidades monoméricas de oligosacárido, compuestas por 2 a 6 monosacáridos (Figura 7). Los monómeros son específicos para cada cepa bacteriana, variando en cada una de ellas la longitud resultante de la concatenación de los mismos (28) (300) (301).

1.4.2.3. Antígeno core.

Esta porción es mucho más corta que el antígeno O y une este con el lípido A (Figura 7). Dentro del core se pueden distinguir dos regiones: la más distal al lípido A, que contiene azúcares como glucosa, galactosa y n-acetilglucosamina, y la más proximal, con heptosa y ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO), que frecuentemente llevan radicales fósforo y fosforiletanolamina. A pesar de tener cierta diversidad estructural, esta es mucho menor que la del antígeno O, ya que sólo existen 6 ó 7 variaciones dentro de las enterobacterias más comunes (28) (300) (301).

1.4.2.4. Lípido A.

La estructura básica del lípido A difiere poco entre los distintos gérmenes gram negativos. Muchas de las acciones biológicas de las endotoxinas dependen de la estructura química única del lípido A. Está constituido por un “armazón “ de disacárido-glucosamina fosforilado al que se unen ácidos grasos de cadena larga. El lípido A se une al core a través del KDO (Figura 7). La hidrólisis ácida rompe la unión al KDO sin detoxificar la endotoxina. La hidrólisis alcalina la detoxifica al romper la unión de los ácidos grasos al lípido A, sin que por ello pierda su antigenicidad (237) (257) (300) (301).

1.4.3. INTERACCION ENTRE ENDOTOXINA Y HUESPED.

1.4.3.1. Absorción de endotoxinas.

No se ha identificado el mecanismo exacto de absorción intestinal de endotoxinas. Hace años que se observó endotoxemia portal en individuos sanos y enfermos hepáticos, mientras que la endotoxemia sistémica sólo se encontró en enfermos hepáticos (41) (101) (141) (143) (180) (186) (203) (247) (248) (272) (286) (349) (350) (358) (359). Otros trabajos no han visto niveles de endotoxemia portal significativos en humanos ni en animales (264) (271) (363). Estas diferencias en cuanto a la incidencia de endotoxemia portal en sujetos sanos son debidas, probablemente, a la distinta sensibilidad de los test. Es posible que la absorción intestinal de endotoxinas se produzca en condiciones normales y estas sean posteriormente aclaradas por el hígado.

La cantidad de endotoxinas puede aumentar en la luz intestinal sin que ello produzca alteraciones morfológicas o funcionales sobre la mucosa ni ocasione endotoxemia significativa (363). Pero cuando existen situaciones patológicas como la isquemia, la obstrucción, la enfermedad inflamatoria intestinal, o la acción de aminas vasoactivas en el transcurso del shock, las bacterias y endotoxinas son absorbidas en grandes cantidades y pasan a la circulación sistémica por vía portal o linfática. En estudios experimentales se ha comprobado que se utiliza con más frecuencia esta última, pero cuando existen alteraciones importantes de la mucosa intestinal, también es importante la vía portal (22) (28) (144) (215) (251) (264) (266) (267) (275) (303) (362) (363).

1.4.3.2. Aclaramiento de endotoxinas

1.4.3.2.1. Aspectos generales.

Mathison et al. (218) estudiaron el aclaramiento sanguíneo y el acúmulo tisular de LPS marcados con I^{125} en conejos, observando que era bifásico. En una primera fase rápida, de aproximadamente 15 minutos, se aclaraba la mayor parte del LPS y en otra más lenta, de varias horas, la fracción restante. Probablemente, el LPS se aclara en la fase rápida sin estar ligado a ninguna proteína plasmática,

mientras en la fase lenta se une, en gran parte, a lipoproteínas de alta densidad, a las de baja densidad, a anticuerpos específicos anti-LPS y a la proteína ligadora de LPS. La velocidad de aclaramiento también depende del tipo de LPS. Estudios autorradiográficos o de inmunofluorescencia demuestran que la mayor parte de la endotoxina administrada es captada por las células de Kupffer hepáticas y, en mucha menor proporción, por monocitos hemáticos y macrófagos esplénicos, renales, pulmonares, suprarrenales y musculares (132) (138) (167) (170) (218) (235) (258).

1.4.3.2.2. Participación de las células de Kupffer en el aclaramiento de endotoxina.

Los estudios sobre aclaramiento de endotoxinas realizados durante el transplante hepático demuestran la importancia que tienen las células de Kupffer en esta función. Se aprecia un gran incremento de la endotoxemia sistémica durante la fase anhepática, que disminuye en un tiempo variable tras la reperfusión del hígado transplantado. El estasis de la circulación portal puede contribuir a la absorción de endotoxinas. Los pacientes con fallo primario del injerto presentan niveles de endotoxemia sistémica muy elevados (140) (150) (233) (306) (342) (385). Para disminuir los efectos nocivos de la endotoxemia en el transplante hepático se ha llevado a cabo la descontaminación selectiva del tubo digestivo antes del mismo, con resultados variables (23) (364) (381).

Como se ha comentado, los enfermos con hepatopatías presentan endotoxemia sistémica, lo que no ocurre en sujetos sanos, muy probablemente por la disminución del aclaramiento hepático. La administración de endotoxinas por vía sistémica venosa demuestra que el filtro pulmonar es ineficaz para su aclaramiento, permitiendo el "spillover" o diseminación de estas a la circulación sistémica hasta que se aclaran en el hígado (51).

Estudios "in vitro" muestran que la captación de LPS por células de Kupffer se produce por pinocitosis, y es un proceso no saturable a concentraciones de endotoxina muy superiores a las fisiológicas. El procesamiento de las endotoxinas en las células de Kupffer es, sin embargo, poco conocido (129) (130) (131) (132) (153) (218).

1.4.3.3. Mediadores de la respuesta biológica a las endotoxinas.

1.4.3.3.1. Aspectos generales.

Clásicamente se ha considerado la endotoxina como un mediador entre bacterias y huésped para el desarrollo de enfermedades. Pero sus efectos biológicos no se suelen deber a una acción directa de la misma, sino a mediadores producidos tras la activación de componentes del sistema inmune, como el complemento y los macrófagos, y la coagulación. La secreción prolongada e inadecuada de estos mediadores lleva a la aparición de los efectos nocivos de las reacciones orgánicas que ellos desencadenan (169) (229) (299).

1.4.3.3.2. Activación del complemento.

El lípido A activa la vía clásica del complemento y el polisacárido, la vía alternativa (Figura 2). Como consecuencia se producen las anafilotoxinas (C3 y C5), cuyos principales efectos son la vasodilatación, la contracción del músculo liso y la quimiotaxis de mononucleares y polimorfonucleares (56) (175) (238) (340) (367).

1.4.3.3.3. Activación de los macrófagos.

Las endotoxinas (LPS) se unen a la proteína ligadora del lipopolisacárido (PLL) y este complejo LPS-PLL se ancla en el receptor CD-14 del macrófago y de otras células, iniciándose la activación celular (45) (84) (164) (299) (322) (371).

El macrófago activo libera tres grupos de mediadores: proteicos como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8); lipídicos como prostaglandinas (PGE₂), tromboxanos (TxA₂) y factor de activación plaquetaria (PAAF); y radicales libres de oxígeno (28) (236) (297) (343).

La activación del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa da origen a las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2α}, y por la de la lipooxigenasa produce leucotrienos (LTC₄). Estos productos son necesarios para la síntesis de interleucinas y para modular la propia acción efectora de los macrófagos. Además, son vasoactivos y estimulan la quimiotaxis (127) (178) (212) (261) (340) (367).

El factor activador plaquetario es producido por los macrófagos tras activación di-

recta o mediada por leucotrienos y prostaglandinas. Es también producido por neutrófilos, plaquetas y células endoteliales. Estimula la agregación plaquetaria, la degranulación de los neutrófilos y el aumento de la permeabilidad vascular (169) (388).

La interleucina 1 es producida directamente por los macrófagos. Desempeña un papel importante en la activación del sistema inmune, actuando sobre los linfocitos. Además, aumenta la adhesividad de las células endoteliales y estimula la coagulación intravascular, la producción de proteínas de fase aguda e incluso de prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de las plaquetas (169) (387).

El factor de necrosis tumoral es un polipéptido sintetizado en diversas células, fagocíticas o no fagocíticas, activadas por endotoxinas, C5₂, antígenos parasitarios o fúngicos, IL-1 y, de forma autocrina, por el mismo TNF. Las células de Kupffer hepáticas constituyen la mayor población de macrófagos tisulares en el hombre, por lo que el hígado tiene un enorme potencial de secreción de TNF. La vida media aproximada es de 15 minutos. Estimula la producción de proteínas de fase aguda y linfocinas, activa células fagocitarias y endoteliales, y es capaz de destruir células tumorales. Puede mediar respuestas beneficiosas o deletéreas dependiendo de la cantidad producida, la duración de la liberación y el ambiente bioquímico circundante determinado por la presencia de otros mediadores (25) (39) (40) (81) (139) (160) (161) (169) (171) (202) (226) (227) (355).

El factor estimulante de colonias es producido por macrófagos y linfocitos B estimulados, a su vez, por la IL-1 procedente de los propios macrófagos. Regula la proliferación y diferenciación de células de la médula ósea, estimula la actividad fagocitaria, la síntesis de prostaglandinas y la secreción de proteasas, y contribuye a inducir tolerancia a endotoxinas (169).

El interferón no es producido directamente por los macrófagos, sino por los linfocitos T activados por la acción conjunta de IL-1 e IL-2. Estimula el metabolismo oxidativo de aquellos y, por tanto, su actividad fagocitaria (47).

Las endorfinas, relacionadas con la etiopatogenia de la hipotensión y el shock séptico, parecen ser sintetizadas tras la estimulación directa de los macrófagos por la endotoxina (340) (367).

1.4.3.3.4. Activación de la coagulación.

Las alteraciones producidas en este sistema por la endotoxina se basan en la actuación sobre las plaquetas, los factores de la coagulación y las células endoteliales, desencadenándose como consecuencia una coagulación intravascular diseminada.

La endotoxina es capaz de provocar una agregación plaquetaria y, secundariamente, una degranulación de las mismas con liberación de sustancias vasoactivas. A esta agregación plaquetaria pueden contribuir el aumento de los niveles de tromboxano A₂, metabolito del ácido araquidónico. Las plaquetas, después de entrar en contacto con la endotoxina, expresan en su membrana el factor plaquetario 3 (FP3).

El factor tisular es producido tras la activación directa de los macrófagos por la endotoxina. Esta glicoproteína sirve de receptor al factor VII, que, después de unirse a ella, se convierte en la forma enzimáticamente activa capaz de iniciar la vía extrínseca. La endotoxina también activa la vía intrínseca a través de la activación del factor XII (Figura 8) (110) (147) (238) (326) (360).

Los macrófagos estimulados por la endotoxina segregan TNF- α , el cual, a su vez, es capaz de inducir la expresión de factor tisular en la membrana de las células endoteliales. De esta manera el endotelio se convierte en una potente superficie trombogénica. También disminuye la producción de prostaciclina, que, al contrario del TxA₂, es un vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. Al mismo tiempo, el desprendimiento de las células endoteliales lesionadas de la pared del vaso pone al descubierto las fibras colágenas, promoviéndose la agregación plaquetaria y el depósito de fibrina (105) (110) (123) (147).

1.4.3.4. Alteraciones producidas por acción de las endotoxinas en los distintos órganos y sistemas.

1.4.3.4.1. Alteraciones hemodinámicas.

Muchos de los mediadores liberados por la acción de las endotoxinas son capaces de producir importantes alteraciones hemodinámicas. Tras la inyección de endotoxinas, es característica la aparición de un estado hiperdinámico sistémico ca-

racterizado por la disminución de las resistencias vasculares y el aumento del consumo de oxígeno y de la temperatura corporal. A nivel pulmonar se producen cambios propios de un distrés respiratorio agudo como hipertensión pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular e hipoxia. La administración repetida de endotoxina en ovejas produce un estado hiperdinámico que incluso persiste después de suspender la inyección de la misma (52) (63) (74) (99) (112) (198) (277).

1.4.3.4.2. Alteraciones del parénquima hepático.

Desde hace años se conoce la capacidad de la endotoxina de origen intestinal para producir daño hepático; son varios los mecanismos descritos para provocarlo. Pueden alterar la integridad de las células endoteliales y activar la coagulación, como se ha expuesto anteriormente, desencadenando la aparición de lesiones hepáticas por isquemia. Cuando se administra la endotoxina a ratas hepatectomizadas, se produce una necrosis hepática masiva que se acompaña de destrucción de células endoteliales y depósitos de fibrina en los sinusoides (165) (234) (248) (249) (364) (388).

La liberación de mediadores y encimas citolíticos secundaria a la interacción entre endotoxina y células de Kupffer altera los hepatocitos. Existe la posibilidad de que las endotoxinas actúen directamente sobre ellos. Se ha visto que aumentan la fragilidad de los lisosomas hepatocitarios, estimulan la degradación del citocromo P-450, alteran morfológicamente y funcionalmente las mitocondrias y disminuye la captación y excreción de sustancias (20) (42) (64) (110) (219) (252).

1.4.3.4.3. Otras alteraciones producidas por las endotoxinas.

La fiebre fue el primer efecto descrito de los producidos por la endotoxina; se debe a una acción directa, o a través de mediadores, sobre los centros termorre reguladores cerebrales. Otro de los efectos clásicos es la neutropenia inicial, por sequestro periférico, seguida de importante neutrofilia. Paralelamente se produce un estímulo de la eritropoyesis.

Tras la administración intravenosa de endotoxina o TNF, aumentan los niveles

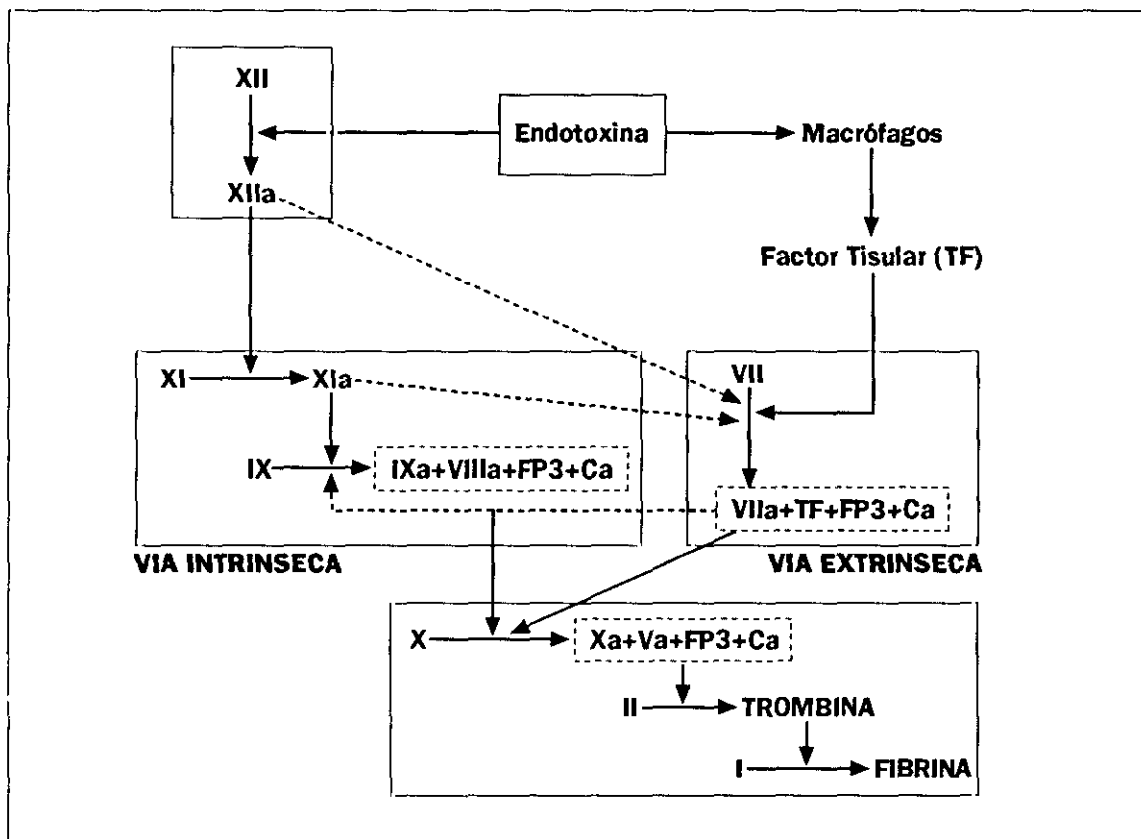


FIGURA 8. Proceso de activación de la coagulación desencadenado por la endotoxina (351).

plasmáticos de cortisol y ACTH. No se han podido demostrar cambios significativos en los niveles de glucosa, insulina y glucagón sistémico. En cuanto al metabolismo lipídico, se han observado elevaciones de los niveles séricos de ácidos grasos libres, colesterol, fosfolípidos y triglicéridos. También estimulan la síntesis hepática de proteínas y la proteólisis muscular, aumentando la liberación de glutamina (112) (228) (241) (294).

1.5. FISIOPATOLOGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR

1.5.1. ASPECTOS GENERALES.

La interrupción del flujo biliar es debida en el 90% de los casos a litiasis, estenosis benignas y tumores que afectan a la vía biliar. Las dos primeras suelen producir una obstrucción incompleta que da lugar a ictericia intermitente y crisis de colangitis por colonización de gérmenes en la bilis estancada. Los tumores causan, generalmente, una obstrucción completa con ictericia progresiva sin colangitis. La obstrucción biliar lleva consigo una retención de componentes biliares, tanto a nivel hepático como sistémico, y un déficit de los mismos en el tubo digestivo. Como consecuencia, se producen alteraciones en la luz intestinal, en el sistema hepatocelular y en el sistema inmune, que, entre otros efectos, provocan la aparición de una endotoxemia responsable de muchas de las complicaciones postoperatorias de estos pacientes (278).

1.5.2. ALTERACIONES DEL SISTEMA HEPATICO.

1.5.2.1. Cambios morfológicos en hígado y sistema excretor biliar.

La obstrucción biliar produce alteraciones histológicas en el sistema excretor y en las células parenquimatosas. En los canalículos se depositan trombos de pigmento biliar y se desestructuran las microvellosidades; progresivamente se vuelven más largos y tortuosos. La extravasación de componentes biliares en los espacio porta ocasiona un "colangiolitis aguda" con importante infiltrado de polimorfonucleares. Los hepatocitos que más precozmente sufren los efectos tóxicos derivados del depósito de bilirrubina, sales biliares y otros componentes de la secreción biliar, son los que están más próximos a dichos espacios. Las sales biliares inhiben el citocromo P-450, se producen alteraciones del retículo endoplásmico liso y rugoso, desestructuración de la membrana celular y, finalmente, destrucción de los hepatocitos; aparece entonces lo que se ha denominado "necrosis en sacabocados" o "peace meal necrosis". Si la obstrucción biliar se prolonga, los fenómenos inflamatorios agudos dan paso al depósito de fibras de reticulina y posteriormente de colágeno; se establece así una fibrosis, que, con el tiempo, se hace irreversible y contribuye a la colestasis y a la aparición de

cirrosis e hipertensión portal. Es difícil determinar cuándo se producen en el hombre estos cambios durante el transcurso de la obstrucción biliar; en la rata, a partir de las dos semanas, existe una fibrosis irreversible con signos de hipertensión portal (134) (278) (284) (317).

1.5.2.2. Alteraciones de la hemodinámica hepática.

La obstrucción biliar, en su fase aguda, suele acompañarse de un aumento reactivo del flujo sanguíneo hepático, quizás para mantener una adecuada función hepática ante la dificultad para segregar la bilis. En la fase crónica de la obstrucción biliar, el flujo sanguíneo tiende a disminuir (2) (32) (134) (177) (217).

1.5.2.3. Alteraciones de la secreción biliar.

La producción de bilis se ve alterada por el aumento de la presión en la vía biliar cuando se interrumpe total o parcialmente el flujo. En experiencias llevadas a cabo en ratas se ha observado que cuando esta presión es de 16 a 17 cm de H₂O, la secreción biliar es un 65% de la normal y cesa completamente cuando la presión es de 20 cm de H₂O. Esta disminución en la producción de bilis está más determinada por la inhibición de la secreción que por un aumento de la absorción de componentes biliares en los propios canalículos (4) (278).

1.5.2.4. Alteraciones de la función hepatocelular.

1.5.2.4.1. Alteraciones de la síntesis proteica.

La síntesis proteica, fundamentalmente de albúmina, es normal en las primeras fases de la ictericia, pero a la larga puede aparecer hipoproteïnemia secundaria al proceso neoplásico que la causa, a la malnutrición y a la cirrosis biliar de las formas crónicas. Existe una menor captación periférica de aminoácidos, aunque los niveles séricos son normales o ligeramente aumentados (259) (341).

La síntesis de enzimas canaliculares está aumentada; tanto la fosfatasa alcalina como la gammaglutamiltranspeptidasa se elevan en sangre hasta alcanzar una meseta. Esta mayor producción es la responsable de que ambas aumenten en obstrucciones

totales y segmentarias. El estímulo para la producción de fosfatasa alcalina se debe a una mayor concentración de sales biliares intrahepatocitarias, pero se desconoce el de la síntesis de gammaglutamiltranspeptidasa (55) (288) (344).

La capacidad para producir factores de coagulación también se mantiene en las primeras fases, aunque existe un alargamiento del tiempo de protrombina por la menor absorción de vitamina K (32).

1.5.2.4.2. Alteraciones de la circulación enterohepática de los ácidos biliares.

La obstrucción biliar conlleva una interrupción de la circulación enterohepática y desencadena un aumento de sales biliares en los hepatocitos y sangre. Como mecanismos compensatorios se producen, una mayor conjugación, sobre todo con sulfato que facilita la eliminación urinaria, una disminución de la síntesis de ciertos ácidos biliares, y un aumento de otros anormales que son más hidrosolubles y por tanto más fáciles de eliminar por el riñón. La acción detergente de los ácidos biliares acumulados en el hepatocito altera de forma importante su membrana (32).

1.5.2.4.3. Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina.

La producción diaria de bilirrubina en humanos es de 250 a 300 mg, de la que cerca del 70 % procede del catabolismo de la hemoglobina en el SMNF, fundamentalmente del bazo y médula ósea. El 30% restante corresponde a hemoproteínas no hemoglobínicas hepáticas como el citocromo P-450. La bilirrubina "no conjugada" va firmemente ligada a la albúmina plasmática. Su entrada en el hepatocito es muy probable que sea mediada por "carrier" y, una vez en su interior, parece unirse a proteínas citosólicas "ligandinas" que impiden la redifusión al plasma y favorecen su entrada en el retículo endoplásmico, donde es conjugada con ácido glucurónico, haciéndose hidrosoluble. Cuando las proteínas ligadoras de bilirrubina se saturan, se produce un aumento de la bilirrubina no conjugada. En la obstrucción biliar completa, la bilirrubina, una vez conjugada, pasa a sangre, y sus niveles, después de un ascenso de días o semanas, suelen llegar a

una meseta a partir de la cual la producción diaria es eliminada por el riñón; valores superiores a los de la meseta sugieren hemólisis o disfunción renal. Esta meseta se alcanza antes en perros y ratas, ya que en ellos existe una mayor fracción de bilirrubina conjugada que es filtrable y presentan, además, una mayor tasa de filtración glomerular respecto al peso. El acúmulo intrahepatocitario de bilirrubina provoca una menor captación de oxígeno por las mitocondrias del hepatocito, disminuye la actividad del citocromo y altera la fosforilación oxidativa. El paso de componentes biliares a la sangre se debe a un reflujo biliolinfático, biliovenoso y transhepatocítico (10) (32) (114) (196) (278) (290) (319) (368).

1.5.2.4.4. Otras alteraciones metabólicas.

La síntesis hepatocitaria de colesterol está disminuida, pero sus niveles séricos aumentan significativamente debido a una disminución de su conversión en sales biliares y a la falta de excreción por la bilis. También es mayor la síntesis de lipoproteínas anormales que pueden interferir con las lipoproteínas de alta densidad (32) (184) (195) (325).

Se ha descrito una intolerancia a la glucosa en animales de experimentación con obstrucción biliar que puede ser debida a una alteración de la fosforilación mitocondrial del hepatocito (259) (375).

1.5.3. ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN LA OBSTRUCCION BILIAR.

1.5.3.1. Translocación de bacterias y endotoxinas como consecuencia de las alteraciones en la barrera mucosa intestinal.

Como se ha comentado anteriormente, en el tubo digestivo existen una serie de mecanismos de defensa específica e inespecífica que contribuyen de forma importante a la actividad del sistema inmune, manteniendo el equilibrio de la flora intestinal y evitando su translocación. Los factores que la provocan son, fundamentalmente, las alteraciones de la flora intestinal, la desestructuración de la mucosa y la depresión de las defensas del huésped (7) (33) (94) (98) (111) (162) (189) (205) (376) (377) (380). Se ha observado translocación bacteriana en diver-

sas situaciones como el shock hemorrágico (291) (334) (384), la isquemia intestinal (275) (292), las quemaduras (8) (96) (246), el tratamiento con fármacos citotóxicos y antibióticos (15) (33) (34), la nutrición parenteral total (16) (128) (176) (287) y la malnutrición severa (89) (92) (98) (336).

Deitch et al (97) han visto un predominio de bacterias gram negativas en el tubo digestivo de ratas después de ligar el colédoco. Al mismo tiempo, hay una mayor translocación de estos gérmenes en los ganglios linfáticos mesentéricos y un edema importante a nivel de la lámina propia. El fenómeno de translocación se ha visto asociado al déficit funcional de linfocitos T, circunstancia que aparece en la obstrucción biliar (309).

1.5.3.2. Alteraciones del sistema mononuclear-fagocítico.

Desde hace años se sabe que la obstrucción biliar produce una disminución de la capacidad fagocitaria del sistema mononuclear-fagocítico. Este hecho es independiente de la situación nutricional del animal de experimentación y se hace evidente a partir de la 1ª ó 2ª semana de haber ligado la vía biliar. El cultivo de células de Kupffer en medios con cantidades elevadas de sales biliares y endotoxina provoca alteraciones morfológicas en el citoplasma de las mismas (18) (80) (108) (172) (173) (348).

1.5.3.3. Alteraciones de linfocitos y neutrófilos.

Diversos animales, después de ligar la vía biliar, presentan una depresión de la respuesta a mitógenos por parte de los linfocitos T (122) (135) (281) (365). Owens et al (268) observaron que los ratones atímicos presentaban un déficit de Ig A, placas de Peyer subdesarrolladas y una mayor incidencia de translocación bacteriana. Posteriormente, Maddaus et al. (206) vieron que la función inmune T-dependiente tenía escasa importancia en el hecho de la translocación, pero, una vez que esta se producía, podía influir en la viabilidad del microorganismo translocado dentro del ganglio linfático.

La función de los neutrófilos también está deprimida en la obstrucción biliar

como lo demuestra el hecho de que ratas a las que se les liga el colédoco y se les induce una peritonitis presentan un aclaramiento bacteriano peritoneal mucho más lento que los controles. Se ha observado, "in vitro", una menor función quimiotáctica, microbicida y lítica de los polimorfonucleares procedentes de individuos con ictericia obstructiva (86) (307) (308).

1.5.4. REPERCUSION DE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN EL ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINAS.

Las alteraciones de la función del sistema inmune descritas en apartados anteriores provocan un aumento en la absorción de endotoxinas y una disminución de su aclaramiento. Ya se ha comentado que, si bien la endotoxemia portal se ha observado en individuos sanos, la endotoxemia sistémica es una circunstancia que aparece en pacientes con algún grado de insuficiencia hepática, entre ellos los que presentan ictericia obstructiva. Se ha demostrado un aumento de complejos inmunes de Ig A coincidiendo con la presencia de endotoxemia sistémica en pacientes con obstrucción biliar. El depósito de estos inmunocomplejos en diversos órganos puede producir daño tisular (24) (132) (204) (247) (263) (271) (286).

La endotoxina contribuye a la depresión de diversos componentes del sistema inmune, perpetuando una situación de círculo vicioso. Niveles elevados de endotoxina dificultan la incorporación de nutrientes a la mucosa intestinal y provocan alteraciones isquémicas de la misma a través de sus mediadores (15) (157) (238) (242) (245) (260) (276) (335) (345) (369).

1.6. COMPLICACIONES PERIOPERATORIAS DE LA CIRUGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR RELACIONADAS CON LA ENDOTOXINA

1.6.1. ASPECTOS GENERALES.

Los pacientes con obstrucción biliar están expuestos a una alta morbimortalidad perioperatoria. En ello influyen los efectos tóxicos de los componentes biliares, la malnutrición y la patología neoplásica. Una revisión llevada a cabo por Dixon et al (106) de 373 pacientes ictericos mostró que la existencia en un mismo enfermo de un hematocrito inferior al 30 %, una bilirrubina mayor de 11.7 mg/dl y enfermedad neoplásica, elevaba el riesgo de mortalidad al 60%.

Algunas de las complicaciones más importantes y frecuentes de la cirugía en enfermos ictericos van a estar determinadas por la depresión del sistema inmune y la endotoxemia procedente del tubo digestivo. De ellas destacan el fracaso renal, las hemorragias gastrointestinales, las alteraciones de la cicatrización y las complicaciones sépticas (19) (49) (101) (155) (209) (259) (282) (352).

1.6.2. ALTERACIONES DE LA FUNCION RENAL.

El fallo renal tras la cirugía por obstrucción biliar fue descrito a principios de siglo por Clairmont y Von Haberer (citado en 369). Los pacientes ictericos presentan una disminución de la tasa de filtración glomerular tras la intervención en más del 60% de casos, y el 9% desarrolla un fracaso renal con una mortalidad asociada superior al 50% (24) (62) (78) (100) (106) (125) (149) (274) (278) (282) (332) (368) (383).

1.6.3. HEMORRAGIA GASTROINTESTINAL.

Esta complicación se ha descrito entre un 6% y un 14% de los pacientes con obstrucción biliar sometidos a cirugía; es la causa del 20% de los fallecimientos en el postoperatorio y, generalmente, se deben a gastritis erosivas. Aunque en ellas puede influir el reflujo duodenogástrico alcalino, es probable que la endotoxina, al igual que en el fracaso renal, sea el factor etiológico más importante. Las alteraciones de la coagulación existentes antes de la intervención no parecen influir en el desencadenamiento de la hemorragia. La aparición de erosiones en estómago

de pacientes cirróticos se asocia, con frecuencia, a endotoxemia sistémica. La endotoxina estimula la secreción gástrica, y en las gastritis erosivas producidas en animales de experimentación tras su inyección se han observado microtrombos de fibrina en los vasos de la mucosa (78) (106) (107) (213) (282) (304).

1.6.4. ALTERACIONES DE LA CICATRIZACION.

Los pacientes intervenidos por obstrucción biliar sufren dehiscencias de la herida operatoria entre el 2% y el 4% de casos, y un 10% a 12.5% desarrollan eventraciones (282). Lee (200) y otros autores (307) demostraron un retraso en la emigración de macrófagos, proliferación de fibroblastos, formación de colágeno y angiogénesis en heridas de animales con ictericia obstructiva. También se ha observado una disminución de los niveles de prolina-hidroxilasa (49). En estas alteraciones puede jugar un papel importante la malignidad de los procesos causantes de la obstrucción biliar y la malnutrición, pero el papel de la endotoxina queda demostrado en trabajos experimentales en los que se observó una mejoría de la cicatrización en ratas ictericas tratadas con sales biliares, capaces de controlar la absorción de endotoxina (21).

1.6.5. COMPLICACIONES INFECCIOSAS.

La depresión del sistema inmune existente en los pacientes con obstrucción biliar aumenta las posibilidades de colonización bacteriana en distintos órganos y sistemas. Entre ellas hay que tener en cuenta la que se puede producir en la propia vía biliar obstruida cuando esta se manipula preoperatoriamente con fines diagnósticos y terapéuticos –30-50% de casos– (48). Además, la endotoxemia derivada de estas colonizaciones tiene efectos más contraproducentes en dichos enfermos que en personas sanas.

Wells et al (378) observaron una incidencia de infección postoperatoria en cirugía biliar igual o mayor que en la cirugía coloproctológica, aunque esta es, en teoría, mucho más contaminante. Pitt et al (282) y Dixon et al (106) han visto que las complicaciones sépticas aparecen en más del 20% de casos, siendo las más frecuentes la infección de la herida de laparotomía y la presencia de bacteriemia.

1.7. ACCION DE LA TERAPIA ADYUVANTE PARA LA RECUPERACION PREOPERATORIA DEL SISTEMA INMUNE EN LA CIRUGIA DE LA OBSTRUCCION BILIAR

1.7.1. DRENAJE BILIAR PREOPERATORIO.

Desde el punto de vista teórico, la maniobra más eficaz para recuperar las funciones del sistema inmune sería la descompresión del árbol biliar y la reposición de la bilis en el tubo digestivo. Whipple (citado en 356), en 1935, describió la duodenopancreatectomía para extirpar tumores de cabeza de páncreas que causaban ictericia obstructiva; para ello realizaba un drenaje de la vía biliar en una primera intervención y la resección en un segundo tiempo. Hoy en día, el drenaje biliar se lleva a cabo mediante la colocación de catéteres transparietohepáticos o por procedimientos endoscópicos (79).

En la revisión de Clements et al (79) se observa que los casos en los que se utilizó el drenaje externo para descomprimir el árbol biliar sin reponer la bilis en el intestino, presentaron resultados contradictorios en cuanto al posible efecto beneficioso de cara a la intervención. Después, con el uso de técnicas de drenaje biliar interno que derivan la bilis al tubo digestivo, se ha conseguido que aquellos sean más uniformemente positivos.

Varios estudios experimentales y ensayos clínicos han permitido explicar los mecanismos por los cuales actúa el drenaje biliar. Algunos autores (102) (152) observaron que el drenaje interno disminuía significativamente la incidencia de endotoxemia portal y sistémica en ratas, mientras que los niveles se mantenían elevados cuando se realizaba un drenaje externo, lo que demuestra la importancia de restituir la bilis en el tubo digestivo.

La recuperación de la función renal, metabolismo hepático y sistema inmune después del drenaje biliar se produce más lentamente que la normalización de los niveles de bilirrubina. Koyama et al (197) han observado que tanto la cetogénesis como la función respiratoria mitocondrial de los hepatocitos tardan unas seis semanas en normalizarse tras la liberación de la obstrucción biliar. Pacientes sometidos a drenaje biliar preoperatorio recuperan muy lentamente la capacidad de

síntesis hepática de ácidos biliares (136). La respuesta linfocitaria a mitógenos, que se encuentra deprimida a los 21 días de ligar la vía biliar en ratas, no comienza a recuperarse hasta la segunda semana de haber realizado un drenaje biliar interno (309) (312). La capacidad de aclaramiento del SMNF se restablece a partir de la 1ª ó 2ª semana (103). Vane et al (365), en estudios llevados a cabo en conejos, han observado que tanto la respuesta linfocitaria a mitógenos como la actividad del SMNF se recuperan mucho más lentamente.

1.7.2. SALES BILIARES.

La administración de sales biliares a enfermos ictericos, fundamentalmente de deoxicolato, disminuye los niveles de endotoxemia portal y sistémica y evita el deterioro de la función renal durante el postoperatorio (60) (61) (62) (117) (273) (352) (353).

Existe cierta controversia acerca del mecanismo de acción de las sales biliares. En un estudio realizado por Cahill et al (60) no se observó que las sales biliares controlaran la flora bacteriana gram negativa del tubo digestivo. Los ácidos biliares, "in vitro", actúan sobre las bacterias y tienen una acción detergente sobre la endotoxina que es capaz de inactivarla (37) (38) (126) (272) (279) (296) (314) (320) (327). Kocsar et al (194) y, más tarde, Bailey et al (24) vieron que los ácidos biliares impedían la absorción de endotoxina. En un estudio experimental (152), el drenaje biliar interno disminuyó los niveles de endotoxemia, pero esto no ocurrió con el drenaje externo. Parece, por tanto, que las sales biliares pueden ejercer una acción directa sobre la endotoxina o sobre su proceso de absorción.

Greve et al (154) han propuesto que más que un efecto directo sobre la endotoxina, los ácidos biliares inhiben la secreción de TNF por los macrófagos. Sin embargo, estos mismos autores (29) no han observado que el control de los niveles de TNF mediante anticuerpos monoclonales disminuya la mortalidad de ratones ictericos.

1.7.3. LACTULOSA.

La lactulosa es un disacárido sintético derivado de la lactosa, cuya estructura química corresponde a 4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructo-furanosa. Clásicamente se ha utilizado para tratar la encefalopatía porto-sistémica. Se ha observado que la administración preoperatoria de lactulosa a enfermos con ictericia obstructiva reduce los niveles de endotoxemia, portal perioperatoria y sistémica postoperatoria, y mejora la función renal (269) (270). También evita la necrosis hepática inducida en ratas con galactosamina, que es mediada por la endotoxina de origen intestinal (142).

Son varios los mecanismos por los cuales la lactulosa podría ejercer su acción terapéutica en la obstrucción biliar. Gracias a su poder osmótico y su capacidad para acidificar, estimula el movimiento del colon y produce un efecto laxante que puede disminuir la absorción de endotoxinas. También puede alterar la flora bacteriana del colon y, por tanto, la producción de aquellas (105). Greve et al (156) han visto que la lactulosa, "in vitro", apenas tiene efecto antiendotoxina, pero inhibe la producción de TNF por los macrófagos estimulados por la esta; aunque es cierto que para ello necesita ser absorbida, circunstancia que no se produce en condiciones normales, sí sería posible en situaciones patológicas en las que se alterara la barrera intestinal.

1.7.4. POLIMIXINA.

Es un antibiótico polipeptídico con capacidad para inactivar la endotoxina "in vitro". Es efectiva en ratas ictericas pero no ha sido capaz de controlar la endotoxemia en humanos (75) (166) (179).

1.7.5. INMUNOMODULACION.

1.7.5.1. Aspectos generales.

En las últimas décadas se ha desarrollado una terapia inmunológica específica para la endotoxina en distintas patologías, basada en la administración de anticuerpos o en el estímulo de su producción con derivados no activos de la misma (202). Menos frecuentemente se han empleado sustancias capaces de llevar a ca-

bo una estimulación inespecífica de elementos del sistema inmune. Bapat et al (27) (86) observaron que un derivado de la *Tinospora Cordifolia* revierte la depresión de la capacidad fagocitaria y microbicida producida en los macrófagos y neutrófilos por la obstrucción biliar.

1.7.5.2. Las hormonas tímicas como agentes inmunomoduladores.

La función inmune del timo quedó establecida cuando Miller (citado en 9), en 1962, observó que la timectomía en ratones recién nacidos originaba la muerte prematura después de la involución del sistema timo-dependiente. Las hormonas tímicas son un grupo de péptidos sintetizados por las células epiteliales del timo que actúan sobre los procesos de proliferación, maduración y activación de los linfocitos T. Sus niveles séricos descienden rápidamente al extirpar el timo o lentamente por la involución con la edad.

De los extractos tímicos se obtienen diferentes péptidos capaces de actuar sobre las distintas funciones del linfocito T; entre ellos se encuentran la timopoyetina, la timosina α -1, la timulina y el factor tímico humoral. La timopentina (TP-5) es un pentapéptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 32 al 36 de la timopoyetina. Otros péptidos sintéticos son la esplenina y la esplenopentina (SP-5).

Las hormonas tímicas se han empleado en infecciones víricas, lepra, tuberculosis, enfermedades autoinmunes, neoplasias e inmunodeficiencias primarias y secundarias (3) (163) (339) (347) (379).

1.7.5.3. Características de la timoestimulina.

1.7.5.3.1. Aspectos generales.

La timoestimulina fue aislada y purificada en 1977 por Falchetti y Bergesi (118). Es un complejo polipeptídico que se obtiene de la glándula tímica bovina y tiene un peso molecular menor de 10.000 Daltons. En la identificación del principio activo, el perfil electroforético presenta una sola banda característica correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 4.500 Daltons.

TABLA I

Tipo celular	Método	Población		Efecto
LINFOCITOS T	Rosetas E con hematíes de carnero.	Adultos sanos.		Incremento mínimo.
		Inmunodeficiencias primarias y secundarias.		Incremento elevado.
	Rosetas E con hematíes de conejo.	Adultos sanos.		Incremento elevado.
	Thy-1 (CdL).	Adultos sanos.		Incremento.
	Thy (rosetas PA). Ensayo de Komuro-Boyse.	Adultos sanos.		Incremento elevado.
LINFOCITOS B	Rosetas E con hematíes de ratón.	Adultos y neonatos.		Sin efecto.
	Receptor de complemento.	Adultos sanos.		Sin efecto.

Efectos "in vitro" de la timoestimulina sobre los marcadores de superficie de los linfocitos (119) (120) (121).

TABLA II

Tipo celular	Método	Población	Efecto
Estudio de proliferación	CML/CMLT	Sanos/cancerosos.	Variable. Tendencia al incremento.
	PHA-Con A	Sanos/cancerosos.	Variable.
	PHA-Con A	BDF ₁ adultos.	Incremento.
	LPS	BDF ₁ adultos.	Sin efecto.
Citotoxicidad	CMLT-Con A	Sanos.	Variable. Tendencia al incremento.
	CML	Inmunodeprimidos (RT/QT).	Restauración completa o parcial.
Producción de Interferón	Con A/CMLT	Sanos.	Incremento

Efectos "in vitro" de la timoestimulina sobre la actividad funcional de los linfocitos (223) (329).

CML: Cultivo mixto de linfocitos.

CMLT: Cultivo mixto de linfocitos tumorales.

PHA: Fitohemaglutinina.

Con A: Concanavalina A.

LPS: Lipopolisacáridos.

1.7.5.3.2. Mecanismos de acción y valoración de su actividad.

La timoestimulina induce la aparición de marcadores de superficie de las células T y, como otras hormonas tímicas, estimula sus procesos de proliferación, diferenciación y activación, tanto en animales como en humanos inmunodeprimidos. En sujetos sanos, el efecto de la timoestimulina no es tan manifiesto como el que ejerce sobre individuos en los que la inmunocompetencia no está desarrollada o se ha deprimido (67) (330). Los ensayos llevados a cabo para el estudio de la acción de la timoestimulina son de dos tipos: los primeros sirven para determinar la acción sobre los marcadores de superficie de células T y B (tabla I); el segundo tipo de ensayos evalúa la función linfocitaria, para lo cual se incuban los linfocitos con timoestimulina y diversos mitógenos (tabla II).

1.7.5.3.3. Farmacodinamia y toxicidad.

La timoestimulina administrada por vía intravenosa o intramuscular, a dosis de 1 ó 2 mg/kg de peso/día, en animales no modifica la presión arterial sistémica, la frecuencia cardíaca y respiratoria, los registros electrocardiográficos ni el tono o motilidad de la musculatura lisa y estriada. Tampoco altera las respuestas presoras, electrocardiográficas y neumográficas a epinefrina, norepinefrina, acetilcolina e histamina. La administración prolongada de dosis elevadas, hasta 100 mg/kg/día, no tiene efecto letal ni modifica el peso corporal ni el aspecto macroscópico o microscópico de los órganos inmunológicos más relevantes, como el bazo o el timo (118).

1.7.5.3.4. La timoestimulina en experimentación animal.

Son escasos los estudios realizados en animales en los que se ha empleado la timoestimulina como tratamiento de infecciones bacterianas (85) (224). Ha sido utilizada más frecuentemente como agente antiviral, disminuyendo la mortalidad, o antitumoral, consiguiéndose mayor supervivencia, tanto en tumores primarios como metastásicos (191) (192) (210).

1.7.5.3.5. La timoestimulina en ensayos clínicos.

La timoestimulina se ha mostrado eficaz en el tratamiento de inmunodeficiencias primarias como el Síndrome de Di George, la aplasia tímica, la ataxia telangiectasia y, en general, las enfermedades relacionadas con la depresión de linfocitos T (6). También se ha utilizado con éxito en diversas inmunodeficiencias secundarias que se suelen asociar a pacientes infantiles, seniles, neoplásicos, quemados o sometidos a radio-quimioterapia. En enfermos quirúrgicos reduce la tasa de complicaciones infecciosas postoperatorias (59) (145) (214) (354).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La cirugía de los enfermos con ictericia obstructiva se ha asociado a unas altas tasas de morbilidad y mortalidad. Muchas de las complicaciones descritas en estos enfermos son consecuencia de las alteraciones existentes en los distintos componentes del sistema inmune, que motivan un aumento de la absorción de endotoxinas a nivel del tubo digestivo y la aparición de una endotoxemia sistémica por un déficit de aclaramiento.

Como se ha expuesto anteriormente, tanto los fenómenos de translocación como la depresión del SMNF están relacionados con un déficit funcional de linfocitos T, que es la población linfocitaria que fundamentalmente se altera en la obstrucción biliar. Las hormonas tímicas poseen una acción moduladora basada en la estimulación de estos linfocitos en individuos inmunodeprimidos.

En base a estos hechos, se planteó la hipótesis de que el tratamiento con timoestimulina de ratas con ictericia obstructiva podría recuperar la función linfocitaria T y controlar la translocación de endotoxinas desde la luz intestinal hacia la circulación portal, así como la aparición de endotoxemia en la circulación sistémica motivada por la disminución de su aclaramiento. Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Desarrollar un modelo de ictericia obstructiva en ratas, simple y eficaz para interrumpir el flujo biliar.
- 2) Estudio de las diferencias ponderales en ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.
- 3) Estudio de las variaciones en los niveles de creatinina en sangre de ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.
- 4) Determinación de la respuesta linfocitaria a Concanavalina A en ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.
- 5) Determinación de los niveles de endotoxemia portal en ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.

- 6) Estudio de las variaciones de los niveles de endotoxemia sistémica en ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.
- 7) Estudio del aclaramiento de endotoxina exógena en ratas con ictericia obstructiva, siete días después de haber ligado la vía biliar, tratadas o no con timoestimulina.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL.

3.1.1. ANIMALES.

Se utilizaron 94 ratas Wistar, machos (n= 69) y hembras (n= 25), de un peso de $347 \pm 10,3g$ (media \pm error estándar). Los animales procedían de la colonia del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

3.1.2. REACTIVOS.

3.1.2.1. Determinaciones bioquímicas en sangre.

- Boehringer Mannheim. Barcelona. España:

- Tiras reactivas para Reflotron:

- Glucosa (ref. nº 744948).

- Triglicéridos (ref. nº 745049).

- Creatinina (ref. nº 745154).

- Amilasa (ref. nº 1200658).

- Bilirrubina (ref. nº 905321).

- GPT (ref. nº 745138).

- GOT (ref. nº 745120).

- GGT (ref. nº 744964).

- Suero control "Precinorm U" (ref. nº 745154).

3.1.2.2. Estudio de la función linfocitaria.

- Gibco. Madrid. España:

- Medio RPMI (ref. nº 074-01800N).

- Suero de carnero fetal al 2% y 5% (ref. nº 011- 06290).

- Sigma. Madrid. España:

- Fungizona (ref. nº F9528).

- Azul de tripano.

- Llorente. Madrid. España:

- Gentamicina (ref. nº 763094).

- Aldrich. Madrid. España:
 - Concanavalina A (ref. nº 86, 142-1).
- Merk. Madrid. España:
 - 2-mercaptoetanol $5 \times 10^{-5} M$ (ref. nº 805740).
- Flow Laboratories. Madrid. España:
 - Glutamina 2mM (ref. nº 16-801-49).
- Amersham. Madrid. España:
 - Timidina [metil- H^3]. (ref. nº TRK418).

3.1.2.3. Determinación de endotoxinas.

- Associates of Cape Cod, Woods Hole. Massachusetts. E.E.U.U.:
 - Reactivo LAL Pyrotell, lote 42-102-544 (ref. nº AE-061).
 - Endotoxina CSE (100 ng/ml), lote 49 de E.coli, potencia= 12,5 UE/ng (ref. nº AE-075).
- Atlas Bioscan Ltd. West Sussex. Gran Bretaña:
 - Agua apirógena (< 0,001 UE/ml), lote 21-01-92 (ref. nº AE-081).

3.1.2.4. Anestésicos.

- Ibys S.A. Madrid. España:
 - Sulfato de atropina a concentración de 1mg/ml.
- Roche S.A. Madrid. España:
 - Diazepam a concentración de 5mg/ml.
- Parke Davis S.A. Madrid. España:
 - Clorhidrato de Ketamina a concentración de 5mg/ml.

3.1.2.5. Otros.

- Laboratorios Difco. Michigan.E.E.U.U.:
 - Lipopolisacárido E.coli 0127:B8.
- Laboratorios Rovi S.A. Madrid. España:
 - Heparina sódica al 1%.

- Sarget. Madrid. España:
 - Povidona Yodada al 10%
- Laboratorios Pérez Giménez. Córdoba. España.
 - Alcohol sanitario al 70° y 96°.

3.1.3. INMUNOMODULADOR.

- Laboratorios de Investigación del Instituto Farmacológico Serono. Roma. Italia:
 - Extracto tímico: Timoestimulina (TP-1).

3.1.4. APARATOS Y MATERIAL FUNGIBLE.

3.1.4.1. Determinaciones bioquímicas en sangre.

- Boehringer Mannheim. Mannheim. Alemania:
 - Espectrofotómetro de reflexión modelo Reflotrón.
- Kubota. Tokyo. Japón:
 - Centrífuga Kubota 5100.
- Eppendorf. Hamburg. Alemania:
 - Pipetas automáticas de 1-1000µl.
 - Tubos de polipropileno de 1 cc³.
- H. ICO S.A. Madrid. España:
 - Jeringas de insulina estériles de polipropileno 25 G.

3.1.4.2. Estudio de la función linfocitaria.

- Dwyer Instr. Inc. Indiana. E.E.U.U.:
 - Cámara de flujo laminar Magnehelic.
- Beckman. Glenrothes. Gran Bretaña:
 - Contador β Beckman LS 1701.
- Scatron Instruments. Lie. Noruega:
 - Recuperador de células o "Cell harvester".
 - Papel de filtro para el recuperador de células. Skatron Filtermats.
- Nikon. Tokyo. Japón:

- Microscopio binocular invertido modelo Nikon Diaphot.
- Lab-Line Instruments Inc. Illinois. E.E.U.U.:
 - Agitador rotatorio modelo Mistral Mixer.
- NAPCO. Illinois. E.E.U.U.:
 - Estufa de incubación modelo NAPCO-5415 IR CO₂ System.
- P-Selecta. Heidelberg. Alemania:
 - Termostato de inmersión electrónico de precisión modelo Precistern.
- Cultek. Madrid. España:
 - Mechero automático modelo Fireboy.
- Tecnomara. Zürich. Suiza:
 - Pipeta automática modelo Pipet Boy.
- Bibby Sterilin Ltd. Staffs. Gran Bretaña:
 - Placas de Petri estériles modelo Sterilin.
- Sarstedt. Hamburg. Alemania:
 - Tubos de polipropileno estériles de 15 ml.
 - Gasas estériles.
 - Tubos de polipropileno de 1 cc³.
- Nunclon T.M. Copenhagen. Dinamarca:
 - Placas microtiter estériles de 96 pozillos.
- Brand. Heidelberg. Alemania:
 - Pipetas "Pasteur" estériles de 5 ml.
 - Cámara de recuento celular "Neubauer".

3.1.4.3. Determinación de endotoxinas.

- Associates of Cape Cod. Woods Hole. Massachusetts. E.E.U.U.:
 - Nefelómetro LAL-5000-II.
- Heidolph Elektro. Kelheim. Alemania:
 - Agitador modelo Vortex REA-2000.
- Atlas Bioscan Ltd. West Sussex. Gran Bretaña:
 - Tubos apirógenos de reacción de 10 x 75 mm (ref. nº AE-110).

- Tubos apirógenos de dilución de 13 x 100 mm (ref.nº AE-112).
- Pipetas apirógenas de 1 y 2 ml (ref.nº AE-136 y AE-137).
- Nichiryō. Tokyo. Japón:
 - Micropipeta ajustable de 10 - 100 µl.
- American National Can. Greenwich. E.E.U.U.:
 - Parafilm.
 - Puntas de pipeta apirógenas.
- Siemens. München. Alemania:
 - Refrigerífico con dispositivo de seguridad.
 - Ordenador personal modelo PCD-2P.
 - Impresora matricial modelo Highprint 3100.
- Viggo-Spectramed. Helsingborg. Suecia:
 - Catéteres intravenosos de polipropileno de 18 G.

3.1.4.4. Instrumental quirúrgico.

- Aesculap. München. Alemania:
 - Caja de instrumental microquirúrgico: 2 pinzas anatómicas, 2 pinzas quirúrgicas, 2 tijeras de disección, una tijera de hilos, 4 pinzas de mosquito, un disector fino, un portaagujas fino y un portaagujas grueso.
- Lorca Marín. Murcia. España:
 - Ligaduras de seda de 4/0 y 5/0.

3.1.4.5. Otros.

- Carl Zeiss. Jena. Alemania:
 - Lupa microquirúrgica binocular.
- Sauter. Hamburg. Alemania:
 - Balanza de precisión de 5g-1000g modelo Sauter SM 1000.
- Wahl Clipper Corporation. Illinois.E.E.U.U.:
 - Esquilador eléctrico modelo Wahl 89 Taper.
- Asik. Kopenhagen. Dinamarca:

- Jeringas de polipropileno desechables de 2, 5 y 10 ml.
- Becton Dickinson. Fraga. España:
- Agujas desechables de 20 G.

3.1.5. MATERIAL PARA ESTUDIO ESTADISTICO.

Se empleó un ordenador JEPSEN 486/ 66 Mhz y el programa BMDP 386 DYNAMIC v. 7.0 y BMDP NEW SYSTEM versión beta (BMDP Statistical Software). Los módulos empleados para la estadística descriptiva y homogeneidad fueron: DM, 1D, 2D, 3D, 4D, 7D, 4F, 2V, 5V, 3S, 1R.

3.2. METODOS

3.2.1. MANEJO DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION.

3.2.1.1. Cuidados generales.

Los animales se mantuvieron en jaulas estándares con capacidad para tres ratas cada una y con libre acceso a comida y bebida, no inferior a 20-45 ml de agua y 12-15 g de pienso por animal y día. Fueron expuestos al ritmo circadiano ambiental con una temperatura que osciló entre 18 y 22 °C y una humedad relativa del 70%. El serrín del fondo, que contenía las excretas, se cambió a diario.

3.2.1.2. Técnica anestésica.

Se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de sulfato de atropina (0.2 ml a concentración de 1 mg/ml), diazepam (0.8 ml a concentración de 5 mg/ml) y clorhidrato de ketamina (1 ml a concentración de 5 mg/ml). Se ajustó la dosis de la mezcla anestésica al peso del animal (1 ml por kilogramo de peso) (115).

3.2.1.3. Técnica quirúrgica para interrumpir el flujo biliar.

Los animales sólo recibieron agua durante las 24 horas previas a la intervención. Todas las operaciones se hicieron en condiciones asépticas. Después de anestesiarse la rata y colocarla en decúbito, fijando sus extremidades, se rasuró el abdomen y se lavó con una solución antiséptica de povidona yodada. Se realizó

una laparotomía media de unos 3 cm de longitud iniciada pocos milímetros por debajo del apéndice xifoides. La localización del antro gástrico facilitó la identificación del duodeno, del que es necesario traccionar para tensar la vía biliar principal (VBP) en el ligamento hepatoduodenal (73) (167). Una vez identificada y disecada esta, se utilizó la técnica de Koch-Weser et al. (193) para interrumpir el flujo biliar. Dicha técnica consiste en realizar una doble ligadura con seda (5/0) de la VBP, una por debajo de la confluencia de los conductos hepáticos lobares y otra justo por encima de la unión con los conductos pancreáticos, extirpando un segmento de la misma entre ambas. El cierre de la laparotomía se llevó a cabo con sutura continua de seda (4/0). Finalmente, se marcó a los animales para su correcta identificación.

3.2.1.4. Técnica para la obtención de muestras de sangre.

3.2.1.4.a. Sangre sistémica.

Se obtuvo por punción directa de la vena yugular interna, tomando como referencia el latido de la arteria carótida común. Se utilizaron agujas y jeringas de insulina lavadas con heparina sódica.

3.2.1.4.b. Sangre portal.

A través de una laparotomía como la descrita previamente, se localizó el confluente venoso mesentérico-portal traccionando del paquete intestinal. Después, se obtuvo una muestra de sangre portal mediante punción directa con aguja y jeringa de insulina lavada con heparina sódica.

3.2.1.5. Técnica de esplenectomía para estudio de la función linfocitaria.

En la misma intervención descrita en el párrafo anterior se llevó a cabo la esplenectomía. Para ello se exteriorizó el bazo traccionando del estómago y se extirpó después de ligar con seda (4/0) y seccionar el pedículo esplénico.

3.2.1.6. Técnica para estudio del aclaramiento de endotoxina.

Se canularon las dos venas yugulares internas a través de una incisión supraclavicular utilizando sendos catéteres Abbocath de 18 G lavados con heparina sódica (283). En uno de ellos se inyectó lipopolisacárido *E. coli* 0127: B8 a dosis de 1 mg/100mg de peso. Por el otro se obtuvieron muestras hemáticas seriadas para estudio del aclaramiento.

3.2.2. DETERMINACION DE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN SANGRE

Las muestras hemáticas fueron centrifugadas inmediatamente después de su extracción, a 4000 rpm, durante 10 minutos. Los sueros resultantes se congelaron a 20 °C hasta su procesamiento con el espectrofotómetro de reflexión.

3.2.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA MITOGENICA A CONCANAVALINA A DE LINFOCITOS T DEL BAZO.

3.2.3.1. Aislamiento de linfocitos del bazo.

Después de extraer los bazos en condiciones de esterilidad, se mantuvieron en medio RPMI con 60 µg/ml de gentamicina y 0.25 µg/ml de fungizona. Posteriormente, fueron triturados sobre gasas estériles, que actuaron como filtro, con el émbolo de una jeringa; las células filtradas se centrifugaron a 1800 rpm durante 4 minutos, desechando el sobrenadante. Se lavaron tres veces con medio RPMI suplementado con gentamicina, fungizona y suero fetal de ternera (FCS) al 2% inactivado a 56 °C durante 30 minutos; finalmente, las células fueron resuspendidas en medio basal completo (RPMI, gentamicina, fungizona, Glutamina 2 mM y β-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y FCS al 5%).

Para el conteo de células se utilizó una cámara de Neubauer y la viabilidad de las mismas se determinó con un colorante de exclusión, tripan blue preparado al 10% en solución isotónica, que permitió distinguir las células vivas de las células no viables por la coloración azul que adquieren estas últimas al penetrar el colorante a través de su membrana alterada (146) (148).

3.2.3.2. Medida de la proliferación celular.

La proliferación celular se determinó en función de la síntesis de DNA después de estimular los linfocitos con la Concanavalina A (Con A) (146). Para medir la síntesis de DNA, los linfocitos resuspendidos en medio basal, a una densidad de 10^5 células/100 μ l, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad en placas de 96 pocillos con distintas concentraciones de Con A. A las 48 horas se añadió 0.5 μ Ci de timidina tritiada (metil-H³) en cada pocillo y se mantuvieron las células 24 horas más en las condiciones de incubación ya señaladas. Después de este tiempo, la timidina tritiada no incorporada se separó con ayuda de un "cell harvester", de tal forma que los núcleos quedaran retenidos en filtros de fibra de vidrio. La timidina tritiada incorporada al DNA se determinó cuantificando, en cuentas por minuto (CPM), la radiactividad de los filtros en un contador de radiación β .

Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IE) y respuesta relativa (RR) calculados según las fórmulas:

$$IE = \frac{\text{CPM (de cada muestra estimulada)}}{\text{CPM (control)}}$$

$$RR = \frac{\text{cpm (animal problema+Con A)-cpm (animal problema basal)}}{\text{cpm (animal control+Con A)-cpm (animal control basal)}}$$

3.2.4. TEST DEL LAL PARA LA DETERMINACION DE ENDOTOXINA.

3.2.4.1. Fundamentos del test del LAL.

El fundamento del test del LAL (Lymulus Amoebocyte Lysate) se basa en la capacidad que tiene el lípido A de desencadenar una reacción de coagulación con el extracto de las células sanguíneas (amebocitos) del *Lymulus polyphemus* ("horseshoe crab"). La endotoxina activa una cascada de proteasas, en presencia de iones de calcio y de magnesio, que hidrolizan el sustrato coagulígeno, dando lugar a la proteína coagulina con capacidad de formar polímeros que generan un estado de gelificación con aumento de la turbidez.

Existen tres tipos principales de ensayos que comparten este mismo fundamento: método de gelificación (180) (256) (286); método turbidimétrico (256); y método cromogénico (35) (168) (186) (203) (256).

3.2.4.2. Procesamiento de muestras de sangre para el ensayo LAL.

Se llevó a cabo con material apirógeno, recogiendo muestras de sangre (0.5 ml) y anticoagulándolas con heparina sódica (15 - 30 UI/ml). Se centrifugaron durante 5 minutos, a 3000 rpm, para separar el suero, que fue congelado a -20 °C hasta su procesamiento. Para su análisis, las muestras de suero se diluyeron al 1/100 con agua apirógena, manteniéndose a temperatura de 65 °C durante 1 hora para eliminar gran parte del efecto inhibitor del plasma en la reacción del LAL. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se mezclaron en un tubo de reacción 400µl de la muestra con 100µl de reactivo LAL. Las muestras se procesaron por duplicado, realizándose diluciones seriadas al 1/10 cuando contenían más de 100 UE/ml.

3.2.4.3. Determinación de endotoxina.

Para medir los niveles de endotoxina se empleó el método cinético turbidimétrico LAL-5000. Se trata de un método automático cuantitativo, con un rango lineal de 0.001 a 100 unidades de endotoxina (UE)/ml, que mide la turbidez del ensayo LAL en función de la densidad óptica cada 10 segundos.

El tiempo de reacción (TR) se define como el tiempo que tarda la mezcla de la muestra y el reactivo LAL en conseguir una determinada turbidez (0.2 unidades de densidad óptica); es menor cuanto mayor sea la concentración de endotoxina, existiendo una correlación lineal entre el logaritmo del TR y el logaritmo de la concentración de endotoxina. La concentración de endotoxina de una muestra problema se obtiene al interpolar el log TR en la recta de calibración obtenida con diluciones de un patrón valorado de concentración estándar de endotoxina (C.S.E.).

En todos los ensayos se empleó como control negativo agua apirógena, y como

controles positivos, una dilución del patrón CSE de 0.01 ng/ml (= 0.125 UE/ml) y una muestra de suero al que se le añadía una concentración conocida de CSE, recuperando siempre el valor diana expresado $\pm 25\%$ (agua) ó $\pm 50\%$ (suero).

3.2.5. ESTUDIO DEL ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINA.

El aclaramiento de endotoxina se expresó como índice fagocítico (IF), determinado según la fórmula:

$$IF = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

* C_1 y C_2 representan las concentraciones de endotoxina en los tiempos T_1 y T_2 .

3.2.6. ADMINISTRACION DEL INMUNOMODULADOR.

La timoestimulina se administró por vía intramuscular, en el músculo quádriceps posterior, a dosis de 6 mg/kg/día durante 7 días.

3.2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se establecieron cuatro grupos experimentales:

1) Grupo control (n=22): fue sometido a una laparotomía con el fin de obtener sangre portal para determinar la concentración de endotoxina y realizar una esplenectomía para estudio de la función linfocitaria. Al mismo tiempo, se obtuvo una muestra de sangre sistémica para determinar la concentración de los distintos parámetros bioquímicos, así como de endotoxina. La función linfocitaria se estudió en nueve animales y el aclaramiento de endotoxina en cuatro.

2) Grupo blanco (n=16): se sometió a una primera laparotomía "blanca" en la que se disecó la VBP sin ligarla ni researla. Además, se tomó una muestra de sangre sistémica para determinación de endotoxina y parámetros bioquímicos. Siete días después, se realizó una segunda laparotomía durante la cual se obtuvo sangre portal para determinar la endotoxina. También se obtuvo sangre sistémica para determinación de parámetros bioquímicos y endotoxina. La función linfocitaria se estudió en siete animales.

3) Grupo icterico (n=42): los animales fueron sometidos a una primera laparotomía en la que se ligó y resecó la vía biliar principal. A continuación, se llevaron a cabo los mismos pasos descritos en el grupo blanco. Se estudió la función linfocitaria en 12 animales y el aclaramiento de endotoxina en seis.

4) Grupo terapéutico (n=14): se realizaron los mismos procedimientos que en el grupo anterior. Entre la primera y la segunda laparotomía, los animales fueron tratados con timoestimulina (TP-1). Se estudió la función linfocitaria en siete animales y el aclaramiento en cuatro.

3.2.8. METODO ESTADISTICO.

3.2.8.1. Recepción de casos.

Se preparó un fichero con 53 variables por cada animal de experimentación, empleando el programa dBASE III+ (Borland). El fichero creado se exportó con el programa DBMSCOPY + (Conceptual Software) a formato BMDP.

3.2.8.2. Depuración.

Se empleó el módulo 4D del programa BMDP v 7.0 para realizar la depuración inicial de los datos. Posteriormente, se obtuvo descriptiva ampliada mediante el módulo 2D para la depuración estadística.

3.2.8.3. Estadística descriptiva.

De las variables cualitativas se obtuvieron frecuencias absolutas, relativas y acumuladas. De las variables cuantitativas se obtuvieron, globalmente y por grupos, la media, desviación típica, error estándar de la media, coeficiente de variación, máximo y mínimo, mediana y cuartiles, intervalo intercuartílico medio, coeficientes de asimetría y curtosis, y estimaciones robustas de la media.

3.2.8.4. Estudio de distribución.

Se estudió la distribución a fin de obtener una distribución teórica ajustable para el análisis de los datos. El ajuste de las variables a la distribución gaussiana se

verificó por medio del test de Shapiro-Wilk's. La distribución de la varianza (homoscedasticidad) se estudió mediante el test de Levene. En caso de detectarse diferencias estadísticamente significativas con la distribución gaussiana, se utilizaron métodos no paramétricos.

En los casos en que la variable no se ajustó a una distribución gaussiana, se emplearon los gráficos diagnósticos de Box-Cox a fin de encontrar una transformación que normalizara y estabilizara las varianzas. Se encontró que en las CPM, IE y RR, la transformación mediante logaritmos en base 10 producía un buen ajuste. Una vez repetida la prueba de Shapiro-Wilk's, se decidió emplear esta transformación en dichas variables. Para aquellos casos en los que no se encontró ajuste válido, se decidió el empleo de pruebas no paramétricas.

3.2.8.5. Estadística analítica.

3.2.8.5.a. Análisis intragrupo.

Se utilizó el test de Kruskal-Wallis, con corrección según tamaño de muestra, como alternativa no paramétrica para el estudio de las variables que no se ajustaron a la curva de Gauss. En los casos en que fue positivo, se obtuvo la comparación múltiple de medias mediante el test de Wilcoxon con corrección de Bonferroni para evitar el aumento del error alfa debido a comparación múltiple de hipótesis. Para las comparaciones 2 a 2 pareadas, que fueron planeadas a priori, se empleó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. En los casos en que se verificó ajuste a la curva de Gauss, se aplicó el análisis de la varianza. Al deshacer la transformación logarítmica, se obtuvo media geométrica y no aritmética.

3.2.8.5.b. Análisis intergrupo.

Para las variables no gaussianas, se empleó el test de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias por medio del test de Wilcoxon-Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. Para las variables con ajuste a la distribución gaussiana se

empleó el modelo mixto de análisis de la varianza para datos repetidos, con una covariante cuando se estudiaron CPM, IE y RR (covariante = concentración de Con A) y tamaños de muestra desiguales y el análisis de la varianza con la corrección de Welch y Brown-Forsythe. La comparación múltiple de medias se realizó empleando el test de Tukey y Bonferroni.

IV. RESULTADOS

4.1. ALTERACIONES PONDERALES.

En la tabla I figuran los datos referentes a edad, sexo y peso de los animales en los distintos grupos de experimentación. La diferencia ponderal entre el peso inicial, antes de la primera laparotomía, y el peso final, una semana después, no fue estadísticamente significativa (e.s.) en el grupo blanco ni en el grupo terapéutico, pero sí en el grupo icterico.

4.2. ALTERACIONES DE PARAMETROS BIOQUIMICOS HEPATICOS

4.2.1. GRUPO CONTROL.

Los resultados aparecen en la tabla II. No se observaron diferencias e.s. entre este grupo y el resto de los grupos de experimentación antes de la primera laparotomía para actuar sobre la vía biliar.

4.2.2. GRUPO BLANCO.

No existieron diferencias e.s. en los valores de los parámetros hepáticos antes y después de manipular la vía biliar.

4.2.3. GRUPO ICTERICO.

En este grupo, los parámetros hepáticos se elevaron, de forma e.s., después de ligar la vía biliar ($p < 0.01$). Las diferencias, en ese momento, fueron también e.s. con respecto al grupo control ($p < 0.01$) y al grupo blanco ($p < 0.01$).

4.2.4. GRUPO TERAPEUTICO.

Como en el grupo icterico, el valor de los parámetros hepáticos se elevó, de forma e.s., con respecto al obtenido antes de ligar la vía biliar ($p < 0.01$). No hubo diferencias e.s. entre ambos grupos después de provocar la obstrucción biliar.

4.3. ALTERACIONES DE LAS CIFRAS DE CREATININA EN SANGRE

4.3.1. GRUPO CONTROL.

Los resultados aparecen en la tabla II. No existieron diferencias e.s. en las cifras de creatinina en sangre, entre este grupo y el resto, antes de actuar sobre la vía biliar.

4.3.2. GRUPO BLANCO.

Se produjo una elevación e.s. de la cifra de creatinina en sangre después de la intervención en la que se manipuló, sin ligar, la vía biliar ($p < 0.01$).

4.3.3. GRUPO ICTERICO.

Después de ligar la vía biliar aumentó, de forma e.s., la cifra de creatinina en sangre ($p < 0.01$).

4.3.4. GRUPO TERAPEUTICO.

En este grupo se elevó la cifra de creatinina, de forma e.s., después de ligar la vía biliar ($p < 0.01$). La cifra obtenida tras la interrupción del flujo biliar fue inferior, aunque no de forma e.s., con respecto a la del grupo icterico.

4.4. RESPUESTA DE LINFOCITOS T A CONCANAVALINA A

4.4.1. GRUPO CONTROL.

En este grupo, el IE aumentó progresivamente con la dosis de Concanavalina A, obteniéndose un valor máximo a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y disminuyendo con concentraciones superiores (Figura 1) (Tabla III).

4.4.2. GRUPO BLANCO.

La evolución del IE en el grupo blanco para las distintas dosis del mitógeno fue similar a la del grupo control, no existiendo en ningún momento diferencias e.s. (Figura 1) (Tabla III).

Los valores de la RR en este grupo aparecen en la tabla IV y están representados en la figura 2.

4.4.3. GRUPO ICTERICO.

Los valores de IE fueron siempre inferiores, de forma e.s., a los del grupo control (Figura 1) (Tabla III).

La RR fue siempre inferior a la del grupo blanco para todas las concentraciones de mitógeno, siendo las diferencias e.s. para concentraciones de 1µgr/ml y 2µgr/ml, respectivamente (Figura 2) (Tabla IV).

4.4.4. GRUPO TERAPEUTICO.

Como ocurrió en el grupo blanco, no existieron diferencias e.s. con respecto al grupo control en los valores del IE. Estos, a su vez, fueron siempre superiores, de forma e.s. ($p < 0.05$ para 0.5 µgr/ml de Con A y $p < 0.01$ para el resto), a los del grupo icterico (Figura 1) (Tabla III).

La RR fue siempre superior a la del grupo blanco, siendo las diferencias e.s. hasta concentraciones del mitógeno de 1µgr/ml. Con respecto al grupo icterico, la RR fue superior, de forma e.s., en todos sus valores ($p < 0.05$ para 1.5 µgr/ml de Con A y $p < 0.01$ para el resto) (Figura 2) (Tabla IV).

4.5. NIVELES DE ENDOTOXEMIA PORTAL

4.5.1. GRUPO CONTROL.

Los resultados aparecen en la tabla V. La cifra de endotoxemia portal en este grupo fue de 0.13 ± 0.02 UE/ml.

4.5.2. GRUPO BLANCO.

La endotoxemia portal, una semana después de manipular la vía biliar, fue inferior a los límites de detección del ensayo. No existieron diferencias e.s. con el grupo control.

4.5.3. GRUPO ICTERICO.

La endotoxemia portal, una semana después de ligar la vía biliar, fue superior, de forma e.s., a la de los grupos blanco y control ($p < 0.05$).

4.5.4. GRUPO TERAPEUTICO.

No existieron diferencias e.s. en la endotoxemia portal, con respecto a los grupos blanco y control, después de ligar la vía biliar. Fue, además, inferior a la del grupo icterico, acercándose esta diferencia a la significación estadística.

4.6. NIVELES DE ENDOTOXEMIA SISTEMICA

4.6.1. GRUPO CONTROL.

Los resultados aparecen en la tabla VI. Los niveles de endotoxemia sistémica en este grupo fueron cercanos al límite de detección del ensayo empleado. No existieron diferencias e.s. con el resto de los grupos antes de que en ellos se manipulara o ligara la vía biliar.

4.6.2. GRUPO BLANCO.

No se observaron diferencias e.s. entre los niveles de endotoxemia sistémica existentes antes y después de manipular la vía biliar. Tampoco existieron diferencias e.s. entre la endotoxemia portal y sistémica después de la manipulación.

4.6.3. GRUPO ICTERICO.

Se produjo un aumento e.s. ($p < 0.05$) de los niveles de endotoxemia sistémica después de ligar la vía biliar; los obtenidos después de provocar la obstrucción biliar fueron inferiores, de forma e.s. ($p < 0.01$), a los de endotoxemia portal.

4.6.4. GRUPO TERAPEUTICO.

No existieron diferencias e.s. entre los niveles de endotoxemia sistémica antes y después de ligar la vía biliar. Los niveles obtenidos después de ligar la vía biliar fueron inferiores, aunque no de forma e.s., a los de los grupos blanco e icterico. No hubo diferencias e.s. entre los niveles de endotoxemia portal y sistémica después de la obstrucción biliar.

4.7. ACLARAMIENTO DE ENDOTOXINA

4.7.1. GRUPO CONTROL.

El índice fagocítico medio (IF) en este grupo fue de 0.056. Los aclaramiento de los cuatro animales estudiados aparecen representados en la figura 3.

4.7.2. GRUPO ICTERICO.

Este grupo presentó un IF de 0.032, valor inferior al grupo control. Los aclaramientos aparecen representados en la figura 4..

4.7.3. GRUPO TERAPEUTICO.

El IF, de 0.092, fue superior al grupo icterico y al grupo control. Los aclaramientos están representados en la figura 5.

TABLA I

	Edad (meses)	Sexo (H/M)	Peso inicial** (gramos)	Peso final*** (gramos)	Diferencia ponderal (gramos)	Significación estadística
GRUPO CONTROL (n = 22)	7.68 ± 0.97*	8/14	421 ± 27			
GRUPO BLANCO (n = 16)	4.94 ± 0.39	6/10	377 ± 16.6	374 ± 16.4	-2.68 ± 3.3	N. S.
GRUPO ICTERICO (n = 42)	3.76 ± 0.2	11/31	311 ± 13.3	298 ± 11.9	-12.9 ± 2.6	p<0.01
GRUPO TERAPEUTICO (n = 14)	3.78 ± 0.21	0/14	303 ± 6	303 ± 5.9	0.25 ± 2.1	N. S.

* Media ± error estándar.

** Peso del animal antes de la primera laparotomía.

*** Peso del animal antes de la segunda laparotomía.

TABLA II

	Bilirrubina (I) mg/dl	Bilirrubina (II) mg/dl	GOT (I) U/l	GOT (II) U/l	GPT (I) U/l	GPT (II) U/l	GGT (I) U/l	GGT (II) U/l	Creatinina (I) mg/dl	Creatinina (II) mg/dl
GRUPO CONTROL (n = 22)	0.5*		58.1±4.41**		24.7±2.16		5		0.54±0.01	
GRUPO BLANCO (n = 16)	0.55±0.05	0.63±0.05	51.2±3.39	98.7±25.8	22.1±1.76	28.2±5.56	5	5	0.52±0.01	0.59±0.02
GRUPO ICTERICO (n = 42)	0.5	9.1±0.34	49.1±2.43	471±38.9	24.4±1.2	118±13.24	5	15.7±2.25	0.52±0.001	0.62±0.016
GRUPO TERAPEUTICO (n = 14)	0.5	7.93±0.43	56.9±3.4	530±30.5	28.2±2.2	109±11.54	5	11.4±1.2	0.52±0.01	0.56±0.01

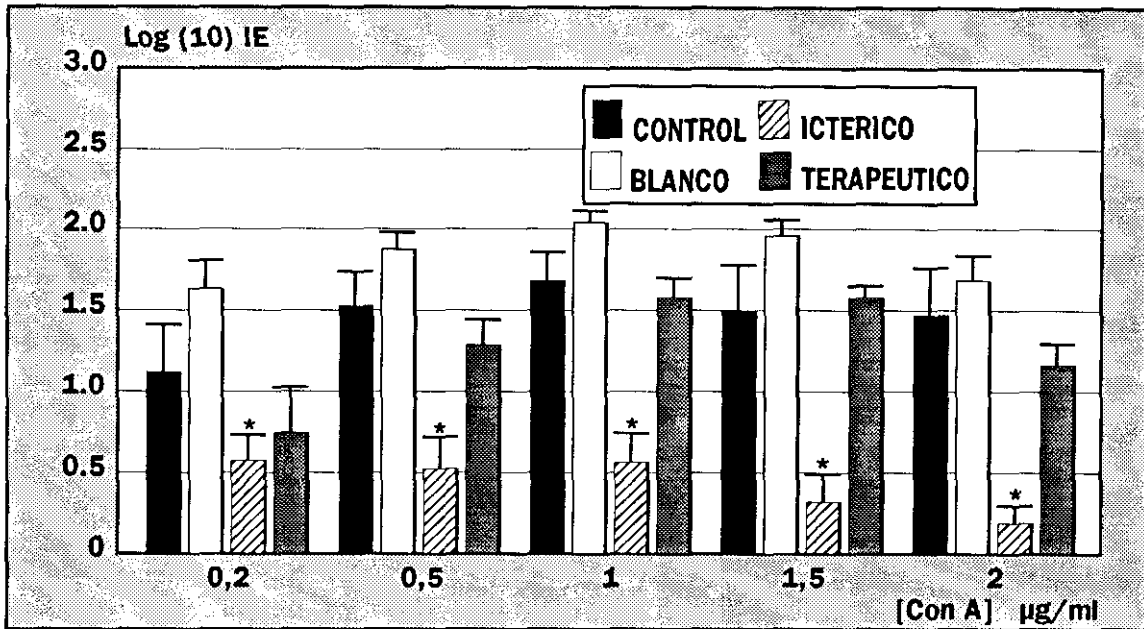
(I) Niveles en sangre sistémica antes de ligar o manipular la vía biliar.

(II) Niveles en sangre sistémica siete días después de ligar o manipular la vía biliar.

* Niveles inferiores al límite de detección del ensayo.

** Media ± error estándar.

FIGURA 1



* p < 0.05 con respecto al grupo control.

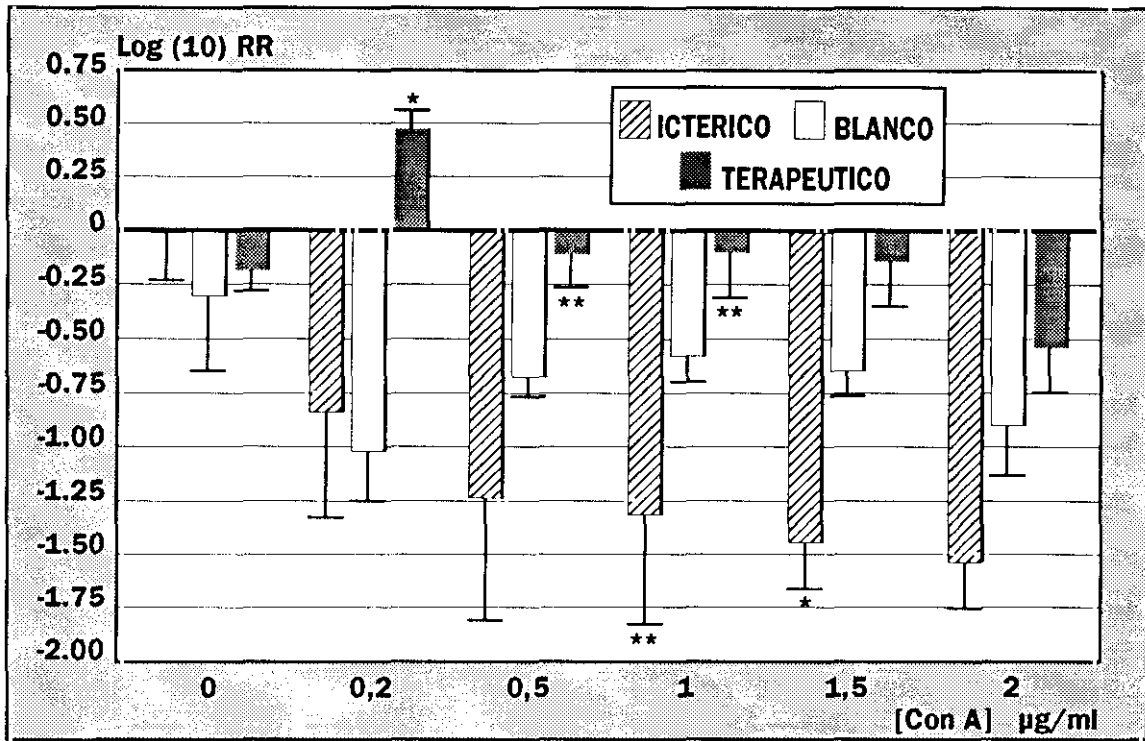
TABLA III

LOG (10) IE

[Con A] µg/ml	0,2	0,5	1	1,5	2
GRUPO CONTROL (n = 9)	1.12 ± 0.25*	1.53 ± 0.18	1.68 ± 0.15	1.50 ± 0.24	1.47 ± 0.25
GRUPO BLANCO (n = 7)	1.63 ± 0.16	1.87 ± 0.10	2.04 ± 0.06	1.36 ± 0.08	1.68 ± 0.14
GRUPO ICTERICO (n = 12)	0.58 ± 0.14	0.53 ± 0.17	0.56 ± 0.16	0.32 ± 0.15	0.13 ± 0.10
GRUPO TERAPEUTICO (n = 7)	0.75 ± 0.24	1.23 ± 0.14	1.58 ± 0.11	1.58 ± 0.07	1.16 ± 0.12

* Media ± error estándar.

FIGURA 2



* $p < 0.05$ con respecto al grupo blanco
 ** $p < 0.01$ con respecto al grupo blanco

TABLA IV

LOG (10) RR

[Con A] µg/ml	0	0,2	0,5	1	1,5	2
GRUPO BLANCO (n = 7)	-0.30 (0.10)*	-0.93 (0.32)	-0.68 (0.17)	-0.58 (0.15)	-0.65 (0.12)	-0.31 (0.22)
GRUPO ICTERICO (n = 12)	-0.009 (0.13)	-1.02 (0.31)	-1.24 (0.21)	-1.32 (0.27)	-1.45 (0.36)	-1.54 (0.30)
GRUPO TERAPEUTICO (n = 7)	-0.18 (0.10)	0.46 (0.10)	-0.11 (0.11)	-0.10 (0.11)	-0.14 (0.12)	-0.54 (0.21)

* Media ± error estándar.

TABLA V

	Endotoxemia portal (UE/ml)	Significación estadística***
GRUPO CONTROL (n = 22)	0.13 ± 0.02*	
GRUPO BLANCO (n = 16)	0.05**	N. S.
GRUPO ICTERICO (n = 42)	2.32 ± 0.56	p<0.01
GRUPO TERAPEUTICO (n = 14)	0.24 ± 0.07	N. S.

* Media ± error estándar.

** Niveles inferiores al límite de detección del ensayo.

*** Significación estadística de las diferencias con respecto al grupo control.

TABLA VI

	Endotoxemia sistémica (I)	Endotoxemia sistémica (II)	Significación estadística***
GRUPO CONTROL (n = 22)	0.15 ± 0.03*		
GRUPO BLANCO (n = 16)	0.087 ± 0.037	0.05**	N. S.
GRUPO ICTERICO (n = 42)	0.097 ± 0.016	0.63 ± 0.24	p<0.05
GRUPO TERAPEUTICO (n = 14)	0.11 ± 0.02	0.24 ± 0.05	N. S.

(I) Niveles de endotoxemia sistémica antes de ligar o manipular la vía biliar.

(II) Niveles de endotoxemia sistémica siete días después de ligar o manipular la vía biliar.

* Media ± error estándar.

** Niveles inferiores al límite de detección del ensayo.

*** Significación estadística de las variaciones de los niveles de endotoxemia sistémica en los distintos grupos antes y después de ligar o manipular la vía biliar.

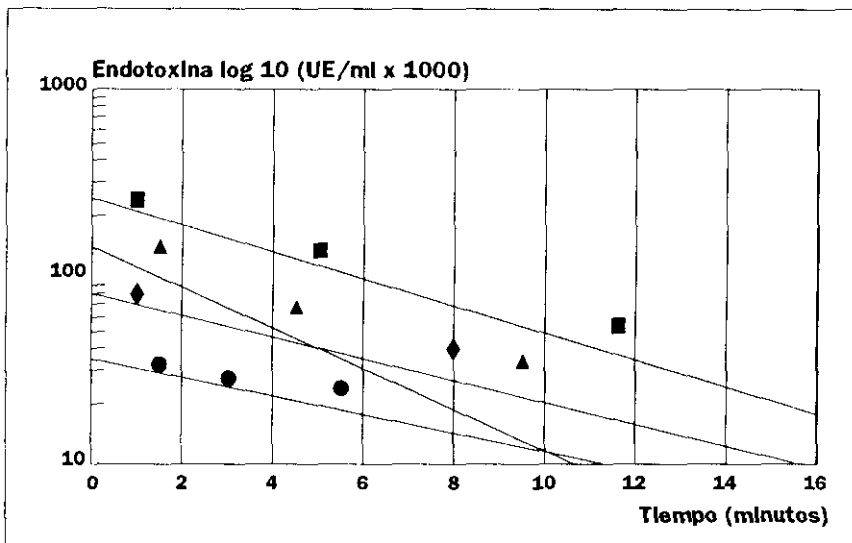


FIGURA 3. Aclaramientos de endotoxina en el grupo control.

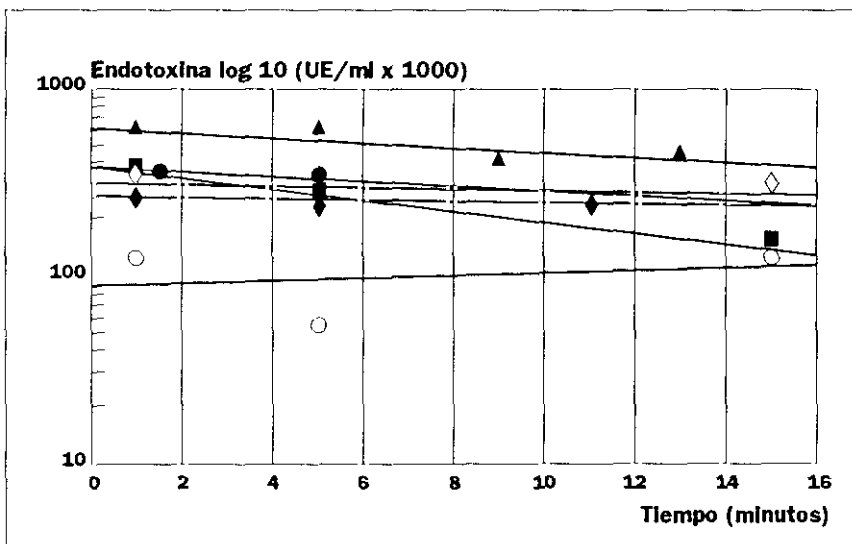


FIGURA 4. Aclaramientos de endotoxina en el grupo icterico.

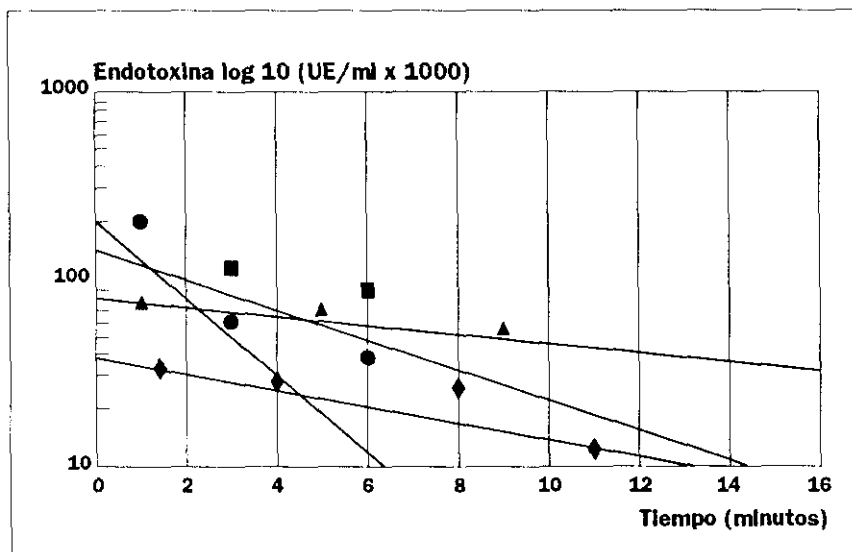


FIGURA 5. Aclaramientos de endotoxina en el grupo terapeutico.

V. DISCUSION

El objetivo del estudio realizado se centró en determinar el efecto terapéutico que la estimulación de los linfocitos T pudiera ejercer sobre la depresión del sistema inmune secundaria a la obstrucción biliar y sus consecuencias. Esto requería un modelo experimental fácilmente reproducible. Por ello se escogió como animal de experimentación la rata, que es estandarizable en cuanto a sexo, genética y alimentación (88). La técnica empleada para interrumpir el flujo biliar, mediante ligadura y exéresis de una parte de la vía biliar (193), fue efectiva en todos los animales en los que se realizó, como lo demostró la ictericia conjuntival y los niveles de bilirrubina alcanzados a la semana de la intervención, similares a los de otros trabajos (80). Este modelo ha sido utilizado ampliamente en la investigación de las alteraciones fisiopatológicas de la ictericia obstructiva (79).

El intervalo de tiempo escogido para llevar a cabo las distintas determinaciones, después de haber ligado la vía biliar, fue de una semana. Se ha comprobado que es suficiente para que la bilirrubina alcance, en ratas, su meseta y se alteren el resto de los parámetros estudiados (10) (80) (201) (243), sin que a la vez se produzcan cambios histológicos irreversibles y en la circulación portal (134).

La determinación de los niveles de endotoxina, al tratarse de un estudio comparativo, exigía la utilización de un método cuantitativo; por ello se descartó la posibilidad de emplear el ensayo de gelificación, que es cualitativo. Tanto el ensayo turbidimétrico como el cromogénico son cuantitativos, puesto que las lecturas se realizan mediante un lector óptico. Se empleó el ensayo turbidimétrico por tener varias ventajas sobre el cromogénico: presenta un mayor rango de linealidad en la cuantificación de endotoxina; tiene mayor sensibilidad para manejar diluciones altas de las muestras, con lo que se atenúa el efecto interferente de diversos componentes del plasma; emplea los reactivos naturales sin la adición de otros sustratos sintéticos; el margen de pH en el que se desencadena la reacción es más amplio (pH 6-8); es más económico; la reacción tiene lugar en tubos de vidrio, mientras que el cromogénico utiliza microplacas de plástico, no pudiendo asegurar la apirogenicidad de los 96 pocillos; por último, el turbidimétrico permi-

te cuantificar individualmente cada tubo, mientras que en el cromogénico la reacción se activa para todos los pocillos simultáneamente, existiendo un error de tiempo desde que se añade el reactivo al primer pocillo y al último (256).

La función linfocitaria se determinó mediante el estímulo de poblaciones de linfocitos T con el mitógeno Concanavalina A. Este método ha sido utilizado anteriormente, detectándose una depresión de la reactividad linfocitaria en los primeros días tras la obstrucción biliar (122) (135). La estimulación se llevó a cabo con distintas dosis del mitógeno, ya que la respuesta de los linfocitos puede ser diferente en función de esta variable.

El estudio del aclaramiento de endotoxina, no previsto en el protocolo inicial, se realizó en un número relativamente escaso de animales. Por este motivo no se pudo hacer análisis estadístico, pero los índices fagocíticos obtenidos muestran diferencias entre los mismos que nos parece interesante exponer. La capacidad fagocitaria del sistema mononuclear-fagocítico ha sido estudiada, tanto en ensayos clínicos como en experimentación animal, con sustancias como albúmina (108), carbón coloidal (172) (173), bacterias (26) (31) (68) (103) (185) (222) (323), partículas de látex (80) y otros (348). La mayoría de estas partículas son captadas por células del SMNF, así como por células endoteliales y parenquimatosas, mientras la endotoxina lo es, casi exclusivamente, por las primeras. La dosis administrada debe ser lo suficientemente alta como para no estimar el flujo sanguíneo hepático más que la función del SMNF (218) (258) (285).

La timoestimulina, inmunomodulador utilizado en el grupo terapéutico, tiene una acción estimulante sobre las poblaciones de linfocitos T en enfermos inmunodeprimidos (119) (120) (121). En un modelo experimental de peritonitis, utilizado por nuestro grupo, se observó un aumento de la quimiotaxis de los macrófagos, y probablemente de su capacidad fagocitaria, en ratas tratadas con este fármaco (224). La dosis administrada se determinó en base a la empleada en este último estudio y a la farmacocinética del principio activo (36) (118), ya que no se había usado previamente este inmunomodulador en un modelo de obstrucción biliar.

En todos los grupos laparotomizados hubo un aumento significativo en los niveles de creatinina. Este aumento fue mayor en el grupo icterico que en los grupos blanco y terapéutico. Son varios los factores que pueden contribuir a las alteraciones de la función renal en el curso de la ictericia obstructiva. Se ha descrito una respuesta hipotensiva anormalmente alta a la depleción de volumen en humanos y animales con obstrucción biliar. Existe mayor reactividad vascular en el riñón a la acción de las catecolaminas, lo que contribuye a un menor flujo renal total y a una redistribución en detrimento del flujo cortical. El sistema renina-angiotensina no parece estar implicado en estos cambios. El aumento de la producción de prostaglandinas podría compensar inicialmente estas alteraciones. La bilirrubina inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial. La bilis parece también alterar la función tubular del riñón. Estos cambios pueden potenciar los efectos de la isquemia en el riñón (72) (259) (332).

Pero aparte de lo expuesto en el párrafo anterior, quizás sea la endotoxina la que más influencia tenga en el desencadenamiento de un fracaso renal durante el postoperatorio de enfermos intervenidos por obstrucción biliar. Wardle y Wright (374) observaron que la administración de una dosis alta de endotoxina provocaba la muerte de ratas ictericas, con importantes depósitos de fibrina en los vasos renales. Trabajos más recientes de los mismos autores (372) (373) y otros investigadores (383) demuestran la relación de la endotoxemia con la aparición del fallo renal, fundamentalmente a través de alteraciones de la coagulación similares a las que se producen en el fenómeno de Sanarelli-Shwartzman (77).

El mecanismo por el cual la endotoxina desencadena una coagulación intravascular en individuos ictericos, sobre todo a nivel renal, se basa en un desequilibrio entre la producción de tromboxano A₂, que es vasoconstrictor y agregador plaquetario, y la de prostaciclina, con acción vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria. Al mismo tiempo, se activa la vía intrínseca de la coagulación y se inhibe la fibrinólisis debido al daño causado en las células endoteliales por la bilirrubina, sales biliares y la propia endotoxina (125). A estas alteraciones también puede contribuir la acción vasoconstrictora de catecolaminas producidas por

estímulo de la endotoxina (74) (368), y la elevación de α -1-antitripsina observada en individuos ictericos (125). Aunque las diferencias en los niveles de creatinina no eran significativas entre los distintos grupos, es posible que si lo fueran para el grupo icterico ante una situación de stress.

Los resultados obtenidos muestran que, a la semana de haber interrumpido el flujo biliar, en el grupo icterico sin tratamiento con timoestimulina existe una depresión de la respuesta de linfocitos T a mitógenos con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos blanco y control. Feduccia et al (122) observaron, en un modelo similar al empleado en este trabajo, que la respuesta a Concanavalina A y otros mitógenos aparecía, ya, deprimida a los tres días de haber ligado la vía biliar. Otros autores han obtenido resultados similares en ratas (309) y en conejos (365). No se ha visto que la obstrucción biliar produzca alteraciones en la función de los linfocitos B (305) (306) (309) (310). Fraser et al (135), en un estudio llevado a cabo en perros, no pudieron demostrar alteraciones en la función de ambas poblaciones linfocitarias dos o tres semanas después de haber ligado la vía biliar.

Aunque la depresión de los linfocitos T es, como se ha expuesto, un hecho constatado por la mayor parte de los autores, no se conoce claramente cuál o cuáles pueden ser los factores etiopatogénicos que la determinan. Los resultados de alguno de los estudios citados (309) y de otros trabajos (4) (83) (151) (157) (172) no demuestran que el deterioro del estado nutricional, observado en individuos ictericos, contribuya a la misma. En nuestro estudio, la diferencia ponderal entre el peso inicial, antes de ligar o manipular la vía biliar, y peso final, una semana después, era e.s. en el grupo icterico pero no en los grupos blanco ni terapéutico. Estos hallazgos podrían indicar que la depresión inmunológica, más que una consecuencia de la desnutrición sea, junto a otros factores, la causa de la pérdida significativa de peso en los animales ictericos. Algunas de los mediadores liberados por los macrófagos tras el estímulo de la endotoxina, como el TNF, están implicados en procesos catabólicos que podría justificarla (355).

Newberry et al (244) observaron que el suero de enfermos con ictericia obstructiva inhibía la respuesta a mitógenos de los linfocitos humanos. Sin embargo,

esta inhibición no se producía si aquel procedía de enfermos a los que se había practicado un drenaje biliar siete días antes. Parece, por tanto, probable la existencia de un factor o factores plasmáticos que pudieran ser los responsables de la depresión inmunológica. Aquellos con los que se especula, pueden sintetizarse en dos que determinan planteamientos fisiopatológicos distintos. Por un lado, estaría el posible efecto tóxico de los componentes biliares. Los linfocitos humanos preincubados con bilirrubina no conjugada tienen una menor respuesta a mitógenos (302) (313) (338). Giani et al (148) vieron las mismas alteraciones cuando los linfocitos se incubaban con ácidos biliares, aunque las concentraciones que se requerían eran mucho mayores que las que existen "in vivo".

Más recientemente, Greve et al (157) han observado que la supresión de la inmunidad celular no se produce cuando se liga la vía biliar en ratas libres de gérmenes. Sin embargo, la administración crónica de endotoxina a estos animales y a ratas normales da lugar a la misma depresión inmunológica que en las ictericas. Estos autores proponen que la causa podría ser la secreción de TNF por macrófagos activados por la endotoxina (154) (156) (158). Este efecto depresor de la inmunidad, mediado por los macrófagos ha sido descrito en otras circunstancias por Ellner et al (113) y Marshall et al (216). Es posible que ninguna de las dos vías etiopatogénicas propuestas actúe de forma excluyente, aunque una de las dos sea la que produzca las alteraciones más precozmente.

En el grupo de ratas con obstrucción biliar a las que se trató con timoestimulina, la respuesta de los linfocitos T a la Concanavalina A no presentaba diferencias e.s. con respecto a los controles. Con cualquiera de los procesos etiopatogénicos anteriormente descritos puede justificar el efecto terapéutico de la timoestimulina, ya que es, por un lado, capaz de evitar la translocación de endotoxinas y, en el caso de que la depresión del sistema inmune comenzara por la acción de los componentes biliares, la timoestimulina es especialmente activa en inmunodeficiencias primarias y secundarias (119) (120), por lo que podría recuperar la función de linfocitos deprimidos por sales biliares o bilirrubina.

En el estudio realizado, los niveles de endotoxemia portal en el grupo control

fueron muy bajos, aproximándose a los límites de detección del ensayo. No se determinó la endotoxemia portal en el resto de los grupos antes de manipular o ligar la vía biliar, ya que la manipulación de la vena porta, dado su pequeño calibre, podía producir alteraciones que interfirieran las determinaciones en la segunda laparotomía. La manipulación de la vía biliar, realizada en el grupo blanco, no produjo diferencias e.s. de los niveles de endotoxemia portal con respecto al grupo control. El grupo icterico, una semana después de ligar la vía biliar, presentaba niveles de endotoxemia portal superiores, de forma e.s., a los del grupo control. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Clements et al (80).

De la revisión de la literatura, puede deducirse la importancia que los componentes biliares tienen en el control de la proliferación y translocación de bacterias y endotoxinas. Deitch et al (97) han visto, en estudios llevados a cabo en ratas, que una semana después de ligar la vía biliar se produce un aumento significativo de la flora gram negativa en la luz del ciego. Además, la concentración de bacterias en los ganglios linfáticos mesentéricos es superior a la de los controles. Rudbach et al (314) observaron que el desoxicolato sódico desintegraba, "in vitro", la endotoxina y abolía algunos de sus efectos biológicos y, Kocsar et al (194), que esta sal biliar era capaz de inhibir la absorción de endotoxinas en ratas. De otros estudios, también se puede deducir el papel de las sales biliares en el equilibrio de la flora intestinal (126) (279). La Ig A-S es segregada en roedores, fundamentalmente, a través de la bilis, por lo que la obstrucción biliar puede disminuir, de forma importante, su presencia en la luz del tubo digestivo (225). En ratas normales, la administración de grandes cantidades de endotoxina oral no produce efectos patológicos (363).

Estudios morfológicos del proceso de translocación en la mucosa intestinal, demuestran que la mayor parte de bacterias y endotoxinas pasan a través del citoplasma de los enterocitos (7). Una vez en la lámina propia, pueden difundirse libremente entre las células de la pared intestinal hasta alcanzar la serosa o ser captadas por los macrófagos distribuidos entre los enterocitos, la lámina propia y las placas de Peyer; después son transportadas a los ganglios linfáticos o pasan a los vasos sanguíneos

os portales (28) (70) (267) (363) (377). Los fenómenos inflamatorios que Deitch et al (97) observaron en la lámina propia de la mucosa intestinal de ratas ictéricas pueden ser debidos a la activación de los macrófagos por la presencia de endotoxinas.

Aunque, como se ha expuesto, el factor de mayor trascendencia para el inicio de la translocación, en el curso de la obstrucción biliar, puede ser el aumento de bacterias y endotoxinas motivado por la ausencia de componentes biliares, la desaparición de los efectos tróficos que la secreción biliar tiene sobre la mucosa intestinal también podría favorecer la translocación (13) (380).

Owens y Berg (268) vieron la relación que existía entre los linfocitos T y la translocación, al observar que esta aumentaba en ratones atímicos; esta alteración era corregida con injertos de timo. Otros autores (17) observaron que estos animales tenían menor cantidad de células productoras de Ig A-S en el tubo digestivo. El tratamiento de ratones con agentes quimioterápicos, como el 5-Fluoruracilo, o inmunosupresores, como la ciclofosfamida, provoca la translocación (33). Sin embargo, no siempre se ha podido demostrar que la supresión de la actividad de las células T la aumente de forma significativa (206). En este mismo estudio, la inyección intraperitoneal de IL-2 la redujo significativamente en ratas a las que se administraban grandes cantidades de *E. coli* C25. Esto llevó a concluir que, aunque los linfocitos T tuvieran un escaso papel para evitar el movimiento bacteriano desde la luz intestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos, sí podían contribuir al control de las bacterias una vez translocadas.

El grupo de ratas ictéricas tratadas con timoestimulina no presentó diferencias significativas en los niveles de endotoxemia portal con respecto a los grupos blanco y control, pero fueron inferiores a las del grupo ictérico, estando esta diferencia en el límite de la significación estadística. Estos resultados coinciden con los de otros estudios (206) en los que se observó que la inmunoestimulación inespecífica sobre los linfocitos T puede controlar la translocación.

Son varios los mecanismos de acción descritos para la timoestimulina, que pueden justificar el control que la misma ejerce sobre la translocación de endotoxinas en ratas ictéricas. Se sabe que aumenta la actividad de las células citotóxicas o NK

(36) (223) (329) e incrementa, "in vitro", la producción de IL-2 e interferon gamma en linfocitos (223). El aumento de la secreción de IL-2 podría activar la producción de Ig A-S (206). Se ha visto que la IL-2 produce una importante proliferación de células NK en los ganglios linfáticos mesentéricos, aunque no es seguro que estas células puedan desarrollar actividad fagocitaria frente a bacterias y endotoxinas. El incremento de la producción de interferon gamma puede aumentar la capacidad microbicida de los macrófagos mediante la inducción de receptores a IL-2 en la membrana (47).

Para llevar a cabo un análisis de los resultados obtenidos en las determinaciones de endotoxemia sistémica y las pruebas de aclaramiento de endotoxina, es importante establecer, de acuerdo con los datos de la literatura, cuáles pueden ser las alteraciones del SMNF en el curso de una obstrucción biliar. Como se expuso en la introducción, este sistema está constituido por macrófagos, que forman el grupo de células accesorias o presentadoras de antígenos dentro del sistema inmune (181). Las células de Kupffer representan el 85% de las mismas y desempeñan un papel importante en el aclaramiento de partículas y gérmenes procedentes del tubo digestivo a través de la circulación portal (44).

Drivas et al (108) observaron, en 1976, que la capacidad fagocitaria del SMNF, medida por el aclaramiento de microagregados de albúmina, se encontraba disminuida en pacientes con ictericia obstructiva. Posteriormente, Holman et al (172) y Ding et al (103) han visto, en ratas, que esta alteración se produce a partir de las dos semanas de haber provocado la obstrucción biliar. Las bacterias que pasan el filtro hepático llegan al pulmón que, a pesar de tener capacidad para captarlas, tiene menor actividad bactericida (185). La incubación de células de Kupffer en medios con ácidos biliares, bilirrubina y endotoxina las altera morfológica y funcionalmente (5) (82) (331).

De trabajos más recientes, se desprende que la actividad de las células de Kupffer, durante el curso de una obstrucción biliar, pasa por distintas fases que podrían influir de forma importante en las alteraciones fisiopatológicas de los enfermos ictericos. En condiciones normales, estos macrófagos se hallan en un microambiente

caracterizado por bajos niveles de arginina, debido a que la enzima arginasa, responsable de la hidrólisis de arginina en ornitina y urea, presenta en hígado concentraciones 25 veces superiores al resto de órganos. Esto permite la producción, por las propias células de Kupffer, de PGE₂ que inhibe la secreción de TNF y, por tanto, sus efectos sistémicos contraproducentes (64). De esta forma, determinadas cantidades de endotoxina y otras partículas presentes en el flujo portal serían eliminadas, sin que ello produjera alteraciones sistémicas. Cuando a aquellas se las somete a un estímulo mantenido, pueden producir inmunosupresión mediada por TNF (211) (216), aumentar su capacidad procoagulante (326) y liberar intermediarios reactivos de oxígeno capaces de producir daño hepático (20).

En la obstrucción biliar concurren, inicialmente, dos circunstancias que podrían desencadenar lo descrito en el párrafo anterior. Por un lado, un mayor nivel de endotoxemia portal, como demuestran los resultados de este trabajo. Por otro, la posible disminución de actividad de la arginasa como consecuencia de las alteraciones metabólicas hepáticas. Así aumentaría significativamente la secreción de TNF capaz de producir la depresión del sistema inmune propuesta por Greve et al. (157).

Se ha comentado que la capacidad de aclaramiento del SMNF aparece disminuida a partir de la segunda semana de ligar la vía biliar en ratas (103) (172). Clements et al (80), utilizando un modelo con el que se estudió de forma selectiva la de las células de Kupffer, a distintos tiempos después de interrumpir el flujo biliar, observaron que, aunque la hiperbilirrubinemia alcanzaba su meseta ya en la primera semana, el aclaramiento no sólo no disminuía sino que era ligeramente superior al de los controles. A pesar de ello, la endotoxemia sistémica apareció aumentada de forma significativa a los siete días, y se elevó más a partir de la segunda semana, momento en el que la depresión de las células de Kupffer se hizo evidente, debida, quizás, a la acción negativa de sus propios mediadores y al efecto tóxico de los componentes biliares.

En el grupo icterico, no tratado con timoestimulina, la endotoxemia sistémica aumentó significativamente después de ligar la vía biliar y la endotoxemia portal fue,

en ese momento, superior, de forma e.s., a la sistémica. La tendencia que se aprecia en el aclaramiento parece indicar que en este grupo está disminuido con respecto al grupo blanco. Estos últimos resultados no coinciden con los del trabajo anteriormente citado (80), si bien en nuestro caso, el aclaramiento se mide en función del tiempo de desaparición de una determinada dosis de endotoxina y no de la cantidad de partículas captadas por el SMNF hepático después de ser inyectadas por vía portal. Independientemente del estado de la capacidad de aclaramiento a la semana de ligar la vía biliar, esta podría no ser la adecuada para eliminar toda la sobrecarga de endotoxinas que afluyen al hígado por vía portal; ello explicaría que, a pesar de existir una cierta eliminación de endotoxinas en el hígado, no se pueda evitar que la endotoxemia sistémica aumente de forma significativa.

En los grupos blanco y el terapéutico no aumentó significativamente la endotoxemia sistémica. Tampoco existieron diferencias significativas entre los niveles de endotoxemia portal y sistémica en ambos grupos, siendo todos ellos muy bajos y próximos a los de detección del ensayo. Con niveles tan bajos de endotoxina en sangre portal, parece poco lógico que se detecte en circulación sistémica; sin embargo, este hallazgo, ya observado (80), puede estar justificado por la existencia de pequeñas cantidades de la misma que pasan a la circulación sistémica a través de los linfáticos, evitando así el hígado (71). Hay una tendencia similar en los aclaramientos del grupo blanco y grupo terapéutico, por lo que es posible que la timoestimulina estimule, directa o indirectamente, los macrófagos de las ratas ictericas, hecho que se ha observado en la peritonitis experimental (224).

En las últimas décadas, ha sido posible operar procesos hepáticos, biliares y pancreáticos, causantes de obstrucción biliar, con técnicas cada vez más agresivas, que exigen una mejor preparación de los enfermos. Creemos que los resultados presentados abren el camino a nuevas posibilidades terapéuticas para recuperar el sistema inmune antes de la cirugía en los pacientes con ictericia obstructiva.

VI. CONCLUSIONES

- 1) El modelo utilizado para producir la ictericia obstructiva, mediante ligadura y sección de la vía biliar, fue un modelo eficaz, en el que se elevaron significativamente los parámetros de colestasis a la semana de interrumpir el flujo biliar.
- 2) La obstrucción biliar produjo un descenso ponderal significativo en el grupo icterico no tratado, pero no en el grupo tratado con timoestimulina.
- 3) Los niveles de creatinina en sangre se elevaron significativamente después de la primera laparotomía para manipular o ligar la vía biliar, siendo el aumento mayor para el grupo icterico no tratado con timoestimulina.
- 4) La obstrucción biliar disminuyó significativamente la respuesta linfocitaria a Concanavalina A en el grupo de ratas ictericas no tratadas, pero no en los animales tratados con timoestimulina.
- 5) La obstrucción biliar produjo un aumento significativo de los niveles de endotoxemia portal en el grupo de ratas ictericas no tratadas, pero no en los animales tratados con timoestimulina.
- 6) La obstrucción biliar elevó significativamente los niveles de endotoxemia sistémica en el grupo de ratas ictericas no tratadas, pero no en los animales tratados con timoestimulina.
- 7) La obstrucción biliar parece disminuir el aclaramiento de endotoxinas en el grupo de ratas ictericas no tratadas, pero no en los animales tratados con timoestimulina.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K., Lichtmann A.H., Pober J.S. Cytokines. en: Abbas A.K., Lichtmann A.H., Pober J.S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991:225-43.
2. Abdel-Aziz G., Lebeau G., Rescan P.Y., Clement B., Rissel M., Deugnier Y. et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol* 1990;137:1333-42.
3. Abiko T., Sekino H. Synthesis of (Glu 34) human splenin (hSP) and examination of its immunological effect on the reduced B-Lymphocytes of uremic patients. *Chem Pharm Bull* 1989;37:391-6.
4. Accatino L., Contreras A., Fernández S., Quintara C. The effect of complete biliary obstruction on bile flow and bile acid excretion: postcholestatic choleresis in the rat. *J Lab Clin Med* 1979;83:706.
5. Adachi Y., Arie S., Sasaoki T., Funaki N., Higashitsuji H., Fujita S. et al. Hepatic macrophage malfunction in rats with obstructive jaundice and its biological significance. *J Hepatol* 1992;16:171-6.
6. Aiuti F., D'Amelio R., Giunchi G. Thymic hormones and their clinical use in immunodeficiency. en: Aiuti F., Wizgell H. Thymus, thymic hormones and T-lymphocytes. New York: Academic Press; 1980:47-54.
7. Alexander J.W., Boyce S.T., Babcock G.F., Gianotti L., Peck M.D., Dunn D.L. et al. The process of bacterial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-512.
8. Alexander J.W., Gianotti L., Pyles T., Carey M.A., Babcock G.F. Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann Surg* 1991;213:558-66.
9. Alexander J.W., Stinnett J.D. Immunotherapeutic approaches to the treatment of infection. en: Simmons R.L., Howard R.J. Surgical infectious diseases. New York: Appleton Century Crofts; 1982:421-2.
10. Ali N.A.M., Billing B.A. Renal excretion of bilirubin by the rat. *Am J Physiol* 1968;214:1340-45.
11. Alonso A. Bases celulares y moleculares del sistema inmune (I). (comunicación

- oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
12. Alonso A. Bases celulares y moleculares del sistema inmune (II). (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
 13. Altman G. Influence of bile and pancreatic secretions on the size of the intestinal villi in the rat. *Am J Anat* 132:167-78.
 14. Alvarez de Mon Soto M. Bases estructurales del sistema inmune (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
 15. Alverdy J.C., Aoye E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired immunodeficient state. *Ann Surg* 1991;214:719-23.
 16. Alverdy J.C., Aoye E., Moss G.S. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988;104:185-90.
 17. Alverdy J.C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. *JPEN* 1990;14:109S-113S.
 18. Andersson R. The influence of biliary obstruction on reticuloendothelial function and mortality in gram-negative sepsis in the rat. *HPB Surg* 1990;2 (Suppl):207.
 19. Armstrong C.P., Dixon J.M., Taylor T.U., Davies G.C. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg* 1984;71:234.
 20. Arthur M.J., Kowalski-Saunders P., Wright R. Effect of endotoxin on release of reactive oxygen intermediates by rat hepatic macrophages. *Gastroenterology* 1988;95:1588-94.
 21. Askew A.R., Bates G.J., Balderson G. Jaundice and the effect of sodium taurocholate taken orally upon abdominal wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 1984;159:207-209.
 22. Azuma K., Akiyama M., Ebata T., Totsuka M., Hayasaka H. Endogenous endotoxin absorption and the role of intestinal lymphatics. *Jpn J Surg* 1983;13:535-39.

23. Badger I.L., Crosby H.A., Kong K.L., Baker J.P., Hutchings P., Elliot P. et al. Is selective decontamination of the digestive tract beneficial in liver transplant patients? Interim results of a prospective, randomized trial. *Transplant Proc* 1991;23:1460-1.
24. Bailey M.E. Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1976;63:774-8.
25. Balibrea J.L. Factor de necrosis tumoral (TNF- α) y shock séptico. *Cir Esp* 1992;52:379-81.
26. Ball S.K., Grogan J.B., Collier B.J., Scott-Conner C.E. Bacterial phagocytosis in obstructive jaundice: A microbiologic and electron microscopic analysis. *Am Surg* 1991;57:67-72.
27. Bapat R., Rege N., Koti R., Desai N., Dahanukar S. Improved survival in surgical jaundice with tinospora cordifolia, an immunomodulator. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):210.
28. Bayston K.F., Cohen J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J Med Microbiol* 1990;31:73-83.
29. 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.
30. Benacerraf B. Functions of the Kupffer cells. en: Roulier C.H. *The liver: morphology, biochemistry, physiology*. New York: Academic Press; 1964:37-62.
31. Benacerraf B., Sebestyen M.M., Sclossman S.A. A quantitative study of the kinetics of blood clearance of P-32- labelled Escherichia Coli and staphylococci by the reticuloendothelial system. *J Exp Med* 1959;110:27-48.
32. Benjamin I.S. Biliary tract obstruction - pathophysiology. 1. en: Blumgart L.H. *Surgery of the liver and biliary tract*. New York: Churchill Livingstone; 1988:111-9.
33. Berg G., Wommack E., Deitch E.A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg* 1988;123:1359-1364.

34. Berg R.D., GA W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403-11.
35. Berger D., Marzinig E., Marzinig M., Beger H.G. Quantitative endotoxin determination in blood-chromogenic modification of the limulus amebocyte lysate test. *Eur Surg Res* 1988;20:128-36.
36. Bergesi G., Falchetti R. Chemical characterization and biological activity of a new thymic extract. *Folia Allergol Immunol Clin* 1977;24:204-8.
37. Bertok K. Physico-chemical defense of vertebrate organisms: the role of bile acids in defense against bacterial endotoxin. *Perspect Biol Med* 1977;21:70-6.
38. Bertok K., Kocsar L.T. Studies on some biological properties of surfactant treated endotoxin in rats. *Ann Immunol Hung* 1972;16:77-81.
39. Beutler B., Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987;316:379-85.
40. Beutler B., Krochin N., Milsark I.W. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232:977-80.
41. Bigatello L.M., Broitman S.A., Fattori I., Di Paoli M., Pontello M., Bevilacqua G. et al. Endotoxemia, encephalopathy, and mortality in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 1987;82:11-5.
42. Billiar T.R., Maddaus M.A., West M.A. Intestinal gram-negative bacterial overgrowth in vivo augments the in vitro response of Kupffer cells to endotoxin. *Ann Surg* 1988;208:532-40.
43. Binder H.J., Filburn B., Floch M. Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organisms. *Am J Clin Nutr* 1975;28:119-25.
44. Biozzi G., Stiffel C. The physiopathology of the reticuloendothelial cells of the liver and spleen. *Prog Liver Dis* 1965;2:166-91.
45. Birkenmaier C., Hong Y.S., Horn J.K. Modulation of the endotoxin receptor CD14 in septic patients. *J Trauma* 1992;32:473-479.
46. Bjorneboe M., Prytz H., Orskov F. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972;1:58-63.

47. Blanchard D.K., Djeu J.Y., Klein T.W., Friedman H., Stewart W.E. Interferon-gamma induction by lipopolysaccharide: dependence on interleukin 2 and macrophages. *J Immunol* 1986;136:963-70.
48. Blenkarn J.I., Benjamin I.S. Infection during percutaneous transhepatic biliary drainage. *Surgery* 1989;105:239.
49. Blumgart L.H. Biliary tract obstruction: New approaches to old problems. *Am J Surg* 1978;135:19-31
50. Bounous G. The intestinal factor in multiple organ failure and shock. *Surgery* 1989;107:118-9.
51. Bradfield J.W.B. Control of spillover- the importance of Kupffer cell function in clinical medicine. *Lancet* 1974;2:883-85.
52. Brande A.I., Carey F.J., Zalesky M. Studies with radioactive endotoxin II. Correlation of physiological effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal doses of E. Coli endotoxin labeled with radioactive sodium chromate. *J Clin Invest* 1955;34:858.
53. Buendía E. Citocinas (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
54. Buendía E. Inmunidad e infección (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
55. Bulle F., Mavier P., Zafrani E.S., Preaux A.M., Lescs M.C., Siegrist S. et al. Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology* 1990;11:545-50.
56. Burke J.F., Gelfand J.A. Manifestaciones iniciales de la inflamación. en: Howard R.J., Simmons R.L. Tratado de infecciones en cirugía. Mexico D.F.: Nueva Editorial Interamericana; 1991:215-23.
57. Burke V., Stone D.E., Beaman J. Effects of biliary diversion on intestinal microflora in the rat. *J Med Microbiol* 1977;10:241-44.
58. Burrell R. Immunomodulation by bacterial endotoxin. *Crit Rev Microbiol* 1990;17:189-208.

59. Businco L., Rossi P. Therapy with thymostimulin of viral disease in immunodeficient patients. en: Aiuti F., Wizgell H. Thymus, thymic hormones and T-lymphocytes. New York: Academic Press; 1980:295-305.
60. Cahill C.J. Prevention of postoperative renal failure in patients with obstructive jaundice- the role of bile salts. *Br J Surg* 1983;70:590-5.
61. Cahill C.J., Pain J.A., Bailey M.E. Bile salts, endotoxin and renal function in obstructive jaundice. *Surg Gynecol Obstet* 1987;165:519-22.
62. Cahill A., Pain J.A. Current practice in biliary surgery. *Br J Surg* 1988;75:1169-72.
63. Cairns C., Bensard D., Winter C., Harken A., Banerjee A. A rapid effect of endotoxin on the myocardium. *Proceedings 48 th Annual Sessions of the Forum on Fundamental Surgical Problems* 1992;:22-4.
64. Callery M.P., Mangino M.J., Flye M.W. A biologic basis for limited Kupffer cell reactivity to portal-derived endotoxin. *Surgery* 1991;110:221-30.
65. Canalese J., Gove C.D., Gimson A.E., Wilkinson S.P., Wardle E.N., Williams R. Reticuloendothelial system and hepatocyte function in fulminant hepatic failure. *Gut* 1982;23:265-9.
66. Carballido J. El sistema inmune en el paciente quirúrgico. Factores generales y específicos asociados a la cirugía (comunicación oral). *Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico*. El Escorial, Madrid; 1992.
67. Carballido J. Inmunoterapia. Estrategias básicas. Aporte exógeno de citocinas. *Inmunoterapia en el arsenal terapeutico de la cirugía actual (comunicación oral)*. *Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico*. El Escorial, Madrid; 1992.
68. Cardoso V., Pimenta A., Da Fonseca C., Sousa Rodrigues J., Machado Vaz J.A. The effect of cholestasis on hepatic clearance of bacteria. *World J Surg* 1982;6:330-34.
69. Caridis D.T., Reinhold R.B., Woodruff P.W., Fine J. Endotoxaemia in man. *Lancet* 1972;:1381-85.
70. Carrico C.J., Meakins J.L., Marshall J.C., Fry D., Maier R.V. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg* 1986;121:196-208.

71. Caruana J.A., Camara D.S., Schneeberger G.J., Nolan J.P. The clearance capacity of the canine liver for a portal vein endotoxin infusion. *J Surg Res* 1984;37:197-201.
72. Carulla X., Oms L., Guirao X., Martinez-Rodenas F., Sitges-Serra A. Measurement of body water compartments in obstructive jaundice in humans. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):36.
73. Castaing D., Houssin D., Bismuth H. Anatomy of the liver and portal system of the rat. Castaing D., Houssin D., Bismuth H. Hepatic and portal surgery in the rat. New York: Masson; 1980:19-29.
74. Cavanagh D., Rao P.S., Sutton D.M.C. Pathophysiology of endotoxic shock in the primate. *Am J Obstet Gynecol* 1970;108:705-22.
75. Cheadle W.G., Hanasawa K., Gallinaro R.N., Nimmanwudipong T., Kodama M., Polk H.C. Endotoxin filtration and immune stimulation improve survival from gram-negative sepsis. *Surgery* 1991;110:785-92.
76. Christou N.V., Mannick J.A., West M.A., Kasper D.L. Lymphocyte-macrophage interactions in the response to surgical infections. *Arch Surg* 1987;122:239-51.
77. Clarkson A.R., McDonald M.K., Fuster V. Glomerular coagulation in acute ischaemic renal failure. *Q J Med* 1970;39:585-99.
78. Clemente C., Bosch J., Rodés J., Arroyo V., Mas A., Maragall S. Functional renal failure and haemorrhagic gastritis associated with endotoxaemia in cirrhosis. *Gut* 1977;18:556-60.
79. Clements W.D., Diamond T., McCrory D.C., Rowlands B.J. Biliary drainage in obstructive jaundice: experimental and clinical aspects. *Br J Surg* 1993;80:834-42.
80. Clements W.D., Halliday M.I., McCaigue M.D., Barclay R.G., Rowlands B.J. Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. *Arch Surg* 1993;128:200/5.
81. Colletti L.M., Remick D.G., Burtch G.D., Kunkel S.L., Strieter R.M., Campbell D.A. Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:1936-43.
82. Collier D.S., Pain J.A., Wight D.G., Lovat P., Bailey M.E. The Kupffer cell in ex-

- perimental extrahepatic cholestasis in the rat- a light microscopy, immunohistochemical and electron microscopy study. *J Pathol* 1986;150:187-94.
83. Cooper W.C., God R.A., Mariani T. Effect of protein insufficiency on immune responsiveness. *Am J Clin Nutr* 1974;27:647-664.
84. Couturier C., Haeffner-Cavaillon N., Caroff M., Kazatchkine M.D. Binding sites for endotoxins lipopolysaccharides on human monocytes. *J Immunol* 1991;147:1899-1904.
85. Cugat E., Visa J., García Valdecasas J.C., Llovera J.M., Fuster J. Efecto de la timoestimulina sobre la inmunidad celular y supervivencia en ratas afectas de peritonitis. *Archivos de la Facultad de Medicina de Zaragoza* 1988;28:160.
86. Dahanukar S., Rege N., Bapat R. Immunosuppression in surgical jaundice. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):38.
87. David H., Reinke P. The concept of the "perisinusoidal function unit" of the liver-importance to pathological processes. *Exp Pathol* 1987;32:193-224.
88. Deerberg F., Pitterman W., Rapp K. Longevity study in Han: Wistar rats: experience in maintaining aging rats for gerontologic investigations. *Interdiscip Topics Geront* 1978;13:66-74.
89. Deitch E.A. Gut failure: its role in the multiple organ failure syndrome. en: Deitch E.A. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic concepts of therapy. New York: Georg Thieme Verlag; 1990:40-59.
90. Deitch E.A. The immunocompromised host. *Surg Clin North Am* 1988;68:181-90.
91. Deitch E.A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990;125:403-4.
92. Deitch E.A., Berg R.D. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. *J Trauma* 1987;27:161-66.
93. Deitch E.A., Berg R., Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-90.
94. Deitch E.A., Bridges W.M., Ma J.W., Ma L., Berg R.D., Specian R.D. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am J Surg* 1990;159:394-401.

95. Deitch E.A., Laundry K.N., McDonald J. Postburn impaired cell-mediated immunity may not be due to lazy lymphocytes but to overwork. *Ann Surg* 1985;201:793-802.
96. Deitch E.A., Maejima K., Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J Trauma* 1985;25:385-92.
97. Deitch E.A., Sittig K., Li M., Berg R., Specian R.D. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990;159:79-84.
98. Deitch E.A., Winterton J., Li M., Berg R. The gut as a portal of entry for bacteremia: role of protein malnutrition. *Ann Surg* 1987;205:681-92.
99. Demling R.H., Lalonde C.C., Jin L.J., Albes J., Fiori N. The pulmonary and systemic response to recurrent endotoxemia in the adult sheep. *Surgery* 1986;100:876-83.
100. Diamond T., Dolan S., Thompson R.L., Rowlands B.J. Development and reversal of endotoxemia and endotoxin-related death in obstructive jaundice. *Surgery* 1990;108:370-75.
101. Diamond T., Dolan S., Thompson R.L., Rowlands B.J. Endotoxemia and endotoxin-related mortality in obstructive jaundice. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):37.
102. Diamond T., Thompson R.L., McGlone E., Rowlands B.J. Endotoxin concentrations following internal and external biliary drainage for obstructive jaundice. *Curr Surg* 1989;46:311-13.
103. Ding J.W., Andersson R., Stenram U., Lunderquist A., Bengmark S. Effect of biliary decompression on reticuloendothelial function in jaundiced rats. *Br J Surg* 1992;79:648-52.
104. 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;25:11-9.
105. Ditter B., Urbaschek R., Urbaschek B. Ability of various adsorbents to bind endotoxins in vitro and to prevent orally induced endotoxemia in mice. *Gastroenterology* 1983;84:1547-52.

106. Dixon J.M., Armstrong C.P., Duffy S.W., Davies G.C. Factors affecting morbidity and mortality after surgery for obstructive jaundice: a review of 373 patients. *Gut* 1983;24:845-52.
107. Dixon J.M., Armstrong C.P., Duffy S.W., Elton R.A., Davies M.S. Upper gastrointestinal bleeding: a significant complication after surgery for relief of obstructive jaundice. *Ann Surg* 1984;199:271-5.
108. Drivas G., James O., Wardle E.N. Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. *Br Med J* 1976;1:1568-69.
109. Dunn D.L. Role of infection and the use of antimicrobial agents during multiple system organ failure. en: Deitch E.A. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic concepts of therapy. New York: Georg Thieme Verlag; 1990:150-71.
110. Durham S.K., Brouwer A., Barelds R.J., Horan M.A., Knook D.L. Comparative endotoxin-induced hepatic injury in young and aged rats. *J Pathol* 1990;162:341-49.
111. Edmiston C.E., Condon R.E. Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet* 1991;173:73-83.
112. Elin R.J., Sheldon M.W. Biology of endotoxin. *Ann Rev Med* 1976;27:127-41.
113. Ellner J.J., Spagnudo P.J. Suppression of antigen and mitogen induced human T lymphocyte DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide: Mediation by monocyte activation and production of prostaglandins. *J Immunol* 1979;123:2698.
114. Epstein. The kidney in liver disease. Better O.S. Bile duct ligation: an experimental model of renal dysfunction secondary to liver diseases. New York: Elsevier Biomedical; 1983:295-311.
115. Erhardt W., Wriedt-Lübbe J., Schnedler M., Neumann C., Pfeiffer U., Pfeiffer W. et al. Anästhesiologische Erfahrungen in der experimentellen Chirurgie. *Anaesthesist* 1979;28:359-67.
116. Ericksson S. Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rats. Bile acids and steroids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:578-82.

117. Evans H.J.R., Torrealba V., Hudd C., Knight M. The effect of preoperative bile salt administration on postoperative renal function in patients with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1982;69:706-8.
118. Falchetti R., Bergesi G., Eshkol A., Cafiero C., Adorini L., Caprino L. Pharmacological and biological properties of a calf thymus extract (Thymostymulin). *Drugs Exp Clin Res* 1977;3:39-47.
119. Falchetti R., Cafiero C., Caprino L. Bioassay for thymic extracts: guinea pig spleen lymphocytes-rabbit red blood cells rosette method. *Cancer Biochem Biophys* 1979;4:69-74.
120. Falchetti R., Cafiero C., Caprino L. Effect of a thymic factor (TS) on the immune response of aged guinea pigs. First International Conference on Immunopharmacology-Brighton, 29 th July-1 st August, 1980.
121. Falchetti R., Caprino L., Cafiero C. Impaired T-cell functions in aged guinea pigs restored by thymostymulin. *Int J Immunopharmacol* 1981;4:1-6.
122. Feduccia T.D., Scott-Conner C.E., Grogan J.B. Profound suppression of lymphocyte function in early biliary obstruction. *Am J Med Sci* 1988;296:39-44.
123. Félez J. Factor tisular: el receptor iniciador de la coagulación. *Sangre* 1991;36 (Sup 3):10-14.
124. Filkins J. Reticuloendothelial clearance of intestinal endotoxins. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 1971;9:480.
125. Fletcher M.S., Westwick J., Kakkar V.V. Endotoxin, prostaglandins and renal fibrin deposition in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1982;69:625-29.
126. Floch M.H., Gershengoren W., Elliot S., Spiro H.M. Bile acid inhibition of the intestinal microflora - a function for simple bile acids ? *Gastroenterology* 1971;61:228-33.
127. Fong Y. The biological activities of cytokines of inflammation: tumor necrosis factor, interleukin 1, interleukin 6. Demling R.H. *Surgical basic science: cytokines/growth factors: basic concepts in clinical relevance*. Chicago: American College of Surgeons; 1992:19-24.

128. Fong Y.M., Marano M.A., Barber A. Total parenteral nutrition and bowel rest modify the metabolic response to endotoxin in humans. *Ann Surg* 1989;210:449-56.
129. Fox E.S. TP, Broitman S.A. Uptake and modification of 125I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Hepatology* 1988;8:1550-1554.
130. Fox E.S., Broitman S.A., Thomas P. Bacterial endotoxins and the liver. *Lab Invest* 1990;63:733-741.
131. Fox E.S. TP, Broitman S.A. Clearance of gut derived endotoxins by the liver. Release and modification of 3H, 14C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 1989;96:456-61.
132. Fox E.S. TP, Broitman S.A. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun* 1987;55:2962-2966.
133. Fox R.A. DF J., Samuels M., Milligan J. Lymphocyte transformation in response to phytohaemagglutinin in primary biliary cirrhosis: The search for a plasma inhibitory factor. *Gut* 1973;14:80.
134. Franco D., Gigon M., Szekely A., Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. *Arch Surg* 1979;114:1064.
135. Fraser I.A., Krakowka S., Ringler S., Carey L.C., Ellison E.C. Lymphocyte function in obstructive jaundice. *Am J Surg* 1989;157:405-9.
136. Fraser I.A., Shaffer P., Tuttle S.V., Lessler M.A., Ellison E.C., Carey L.C. Hepatic recovery after biliary decompression of experimental obstructive jaundice. *Am J Surg* 1989;158:423-27.
137. Freudenberg M.A., Galanos C. Metabolic fate of endotoxin in rat. *Adv Exp Med Biol* 1990;256:499-509.
138. Freudenberg M.A., Neß T., Kumazawa Y., Galanos C. Die Bedeutung von Zytokinen beim Endotoxinschock und bei der Endotoxinüberempfindlichkeit. *Immun Infekt* 1993;21:40-4.
139. Függer R., Hamilton G., Steininger R., Mirza D., Schulz F., Mühlbacher F. Intraoperative estimation of endotoxin, TNF, and IL-6 in orthotopic liver trans-

- plantation and their relation to rejection and postoperative infection. *Transplantation* 1991;52:302-6.
140. Függer R., Hamilton G., Rogy M., Herbst F., Kwasny W., Schemper M. et al. Prognostic significance of endotoxin determination in patients with severe intraabdominal infection. *J Infect Dis* 1990;161:1314-5.
141. Fulenwinder J.T., Sibley C., Stein S.F., Evatt B., Nordlinger B.M., Ivey G.L. Endotoxemia of cirrhosis: an observation not substantiated. *Gastroenterology* 1980;78:1001-4.
142. Fulton J.D. Lactulose as an anti-endotoxin in liver transplantation. *Lancet* 1989;:927-8.
143. Gaeta G.B., Perna P., Adinolfi L.E., Utili R., Ruggiero G. Endotoxemia in a series of 104 patients with chronic liver diseases: prevalence and significance. *Digestion* 1982;23:239-44.
144. Gans H., Matsumoto K. The escape of endotoxin from the intestine. *Surg Gynecol Obstet* 1974;139:395-402.
145. García Valdecasas J.C., Mainer A., Cugat E., Grande L., Fuster J., Lacy A.M. et al. Adenocarcinoma de colon y estado inmunitario. Efecto de la timoestimulina durante el curso postoperatorio. *Cir Esp* 1991;49:191-194.
146. García L., Perez Castillo A., Moreno J., Alemany S. β -Endorphin inhibits interleukin-2 release and expression of interleukin-2 receptors in concanavalin A-stimulated splenic lymphocytes. *Lymphok Cytok Res* 1992;11:339-45.
147. Gaynor E. Increased mitotic activity in rabbit endothelium after endotoxin. An autoradiographic study. *Lab Invest* 1971;24:318-20.
148. Gianni L., Di Padova F., Zuin M., Podda M. Bile acid-induced inhibition of the lymphoproliferative response to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen: An in vitro study. *Gastroenterology* 1980;78:231.
149. Gliedman M.L., Carroll H.J., Popowitz L. An experimental hepato-renal syndrome. *Surg Gynecol Obstet* 1970;131:34-40.
150. Goto M., Takei Y., Kawano S., Tsuji S., Fukui H., Fushimi H. et al. Tumor ne-

- crisis factor and endotoxin in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992;16:487-93.
151. Gouma D.J., Roughneen P.T., Kumar S. Changes in nutritional status associated with obstructive jaundice and biliary drainage in rats. *Am J Clin Nutr* 1986;44:362-69.
 152. Gouma D.J. CJ C.U., Fisher J.D., Schlegel J.F., Li Y.F., Moody F.G. Endotoxemia after relief of biliary obstruction by internal and external drainage in rats. *Am J Surg* 1986;151:476-9.
 153. Greene R., Wiznitzer T., Rutenberg S., Frank E., Fine J. Hepatic clearance of endotoxin absorbed from the intestine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961;108:261.
 154. Greve J.W., Gouma D.J., Buurman W.A. Bile acids inhibit endotoxin induced tumour necrosis factor production by monocytes: an in vitro study. *Hepatology* 1989;10:454-458.
 155. Greve J.W., Gouma D.J., Buurman W.A. Complications in obstructive jaundice: role of endotoxins. *Scand J Gastroenterol-Suppl* 1992;194:8-12.
 156. Greve J.W. GD J., van Leeuwen P.A.M., Buurman W.A. Lactulose inhibits endotoxin-induced tumour necrosis factor production by monocytes. An in vitro study. *Gut* 1990;31:198-203.
 157. Greve J.W. GD J., Soeters P.B., Buurman W.A. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study in germfree rats. *Gastroenterology* 1990;98:478-485.
 158. Greve J.W. MJ G., Tiebosch T., Buurman W.A., Gouma D.J. Prevention of postoperative complications in jaundiced rats.- Internal biliary drainage versus oral lactulose. *Ann Surg* 1990;212:221-227.
 159. Greve J.W. MJ G., Buurman W.A., Gouma D.J. Prevention of postoperative complications in jaundiced rats. Internal biliary drainage versus oral lactulose. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):214.
 160. Grimble R.F. Cytokines: their relevance to nutrition. *Eur J Clin Nutr* 1989;43:217-30.

161. Grimble G., Payne-James J.J., Rees R., Silk D.B.A. Enteral nutrition: novel substrates. *Intensive Ther Clin Monit* 1989;10:51-7.
162. Gurwith M., Truog K., Hinthorn D., Liu C. Trimethoprim-sulfamethoxazole and trimethoprim alone for prophylaxis of infection in granulocytopenic patients. *Rev Infect Dis* 1982;4:593-601.
163. Hadden J.W. Immunopharmacology, immunomodulation and immunotherapy. *JAMA* 1987;258:3005-10.
164. Haeffner-Cavaillon N., Cavaillon J.M., Etievant M., Lebbar S., Szabo L. Specific binding of endotoxin to human monocytes and mouse macrophages: serum requirement. *Cell Immunol* 1985;91:119-31.
165. Hanai T., Yura J., Ogino K., Hori K., Suzuki T. Thromboxane as a possible hepatotoxic factor increased by endotoxemia in obstructive jaundice. *Jpn J Surg* 1989;19:556-62.
166. Hanasawa K., Tani T., Kodama M. New approach to endotoxic and septic shock by means of polymixin B immobilized fiber. *Surg Gynecol Obstet* 1989;168:323-31.
167. Hardison W.G., Weiner R.G, Hatoff D.E., Miyai K. Similarities and differences between models of extrahepatic biliary obstruction and complete biliary retention without obstruction in the rat. *Hepatology* 1983;3:383-90.
168. Harris R., Stone P., Stuart J. An improved chromogenic substrate endotoxin assay for clinical use. *J Clin Pathol* 1983;36:1145-9.
169. Hau T. Bacteria, toxins, and the peritoneum. *World J Surg* 1990;14:167-75.
170. Herring W.B., Herion J.C., Walker R.I., Palmer J.G. Distribution and clearance of circulating endotoxin. *J Clin Invest* 1963;42:79.
171. Hesse D.G., Tracey K.J., Fong Y., Manogue K.R., Palladino M.A., Cerami A. et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;166:147-53.
172. Holman J.M., Ridders L.F. Biliary obstruction and host defense failure. *J Surg Res* 1982;32:208-13.

173. Holman J.M., Rikkers L.F. Reticuloendothelial function and biliary obstruction. *Curr Surg* 1980;37:366-7.
174. Holmberg J.T., Hederstrom E., Ihse I. A method to prevent recanalization of the transected bile duct in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1985;20:428-32.
175. Horn J.K., Goldstein I.M., Flick M.R. Complement and endotoxin-induced lung injury in sheep. *J Surg Res* 1984;36:420-27.
176. Hughes C.A., Bates T., Dowling A.H. Cholecystokinin and secretin prevent the intestinal mucosal hypoplasia of total parenteral nutrition in the dog. *Gastroenterology* 1978;75:34-41.
177. Hunt D.R. Changes in liver blood flow with development of biliary obstruction in the rat. *Aust NZ J Surg* 1979;49:733-7.
178. Ildstad S.T. The five components of the immune system: interactions in the immune response. In: Demling R.H. *Surgical Basic Science: cytokines-growth factors: basic concepts in clinical relevance*. Postgraduate course. American College of Surgeons. New Orleans, october 1992:3-8.
179. Ingoldby C.J. The value of polymixin B in endotoxaemia due to experimental obstructive jaundice and mesenteric ischaemia. *Br J Surg* 1980;67:565-7.
180. Jacob A.I., Goldberg P.K., Bloom N., Degenstein G.A., Kozinn P.J. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977;72(1268-70):
181. Jaraquemada D., M.Marti. Presentación de antígeno a células T: diferentes vías de procesamiento para moléculas de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad. *Inmunología* 1991;10:109-17.
182. Jorda J. Bases celulares del sistema inmune III (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
183. Jorda J. Metodología y valoración del sistema inmune en la práctica clínica (comunicación oral). Introducción al sistema inmune e implicaciones en el paciente quirúrgico. El Escorial, Madrid; 1992.
184. Juppner H., Rittinghaus E.F., Ahlgrimm M., Burdelski M., Dralle H. C-terminal

- PTH (70-84) after biliary ligation in rats: implication for the diagnostic importance in hepatobiliary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;139:633-36.
185. Katz S., Grosfeld J.L., Gross K., Plager D.A., Ross D., Rosenthal R.S. et al. Impaired bacterial clearance and trapping in obstructive jaundice. *Ann Surg* 1984;199:14-20.
186. Kawamura S., Hirayama K., Mishima M., Miyaji K., Akiyama T., Mitsuoka T. Endotoxic activity in faeces of mice from different microbiological environments. *Res Microbiol* 1990;141:1095-1101.
187. Keane R.M., Collins P.B., Johnson A.H., Bouchier-Hayes D. Delayed homograft rejection following common bile duct ligation: in vivo evidence that obstructive jaundice is immunosuppressive. *Ir J Med Sci* 1986;155:143-46.
188. Keller R., Engley F.B. Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;18:577.
189. Kennedy M.J., Volz P.A. Ecology of candida albicans gut colonization: inhibition of candida adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* 1985;49:654-63.
190. Kispert P., Caldwell M.D. Metabolic changes in sepsis and multiple organ failure. en: Deitch E.A. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic concepts of therapy. New York: Georg Thieme Verlag; 1990:104-25.
191. Klein A.S., Fixler R., Lang R., Shoham J. Effective antiviral activity of the thymic extract (Thymostymulin) on mice lethally infected with mengovirus. *Abstr 12 th International Cong Chemoter. Florence 1981;*
192. Klein A.S., Shoham J. Effect of the thymic factor, Thymostymulin (TP-1) on the survival rate of tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1981;41:3217-21.
193. Koch-Weser D., Meyer K.A., Yesinick C., Popper H. Influence of the site of experimental biliary obstruction upon functional and morphologic hepatic injury. *Lab Invest* 1952;1:334.
194. Kocsár L.T., Bertók L., Várterész V. Effect of bile acids on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *J Bacteriol* 1969;100:220-23.
195. Komai K., Sabesin S.M., Weidman S.W. Inhibition of hepatic triglyceride se-

- cretion and exogenous triglyceride clearance in the cholestatic rat. *Atherosclerosis* 1987;64:147-53.
196. Kountouras J., Scheuer P.J., Billing B.H. Effect of prolonged bile duct obstruction in the rat on hepatic transport of bilirubin. *Clin Sci* 1985;68:341-47.
197. Koyama K., Takagi Y., Kenji I., Sato T. Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice. *Am J Surg* 1981;142:293-99.
198. Kreimeier U., Morandeira J.R., Messmer K. Endotoxemia hiperdinámica experimental en el cerdo. Cambios en la microcirculación, función pulmonar y flujo sanguíneo regional orgánico. *Cir Esp* 1992;52:169-75.
199. Lanser M.E. Reticuloendothelial system failure. en: Deitch E.A. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic cocepts of therapy. New York: Georg Thieme Verlag; 1990:72-86.
200. 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.
201. Lennard T.W., Shenton B.K., Borzotta A., Donnelly P.K., White M., Gerrie L.M. et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg* 1985;72:771-76.
202. Lowry S.F. Modulating the inflammatory response. In: Demling R.H. Surgical basic science: cytokines-growth factors: basic concepts in clinical relevance. Postgraduate course. American College of Surgeons. New Orleans, october 1992:25-31.
203. Lumsden A.B., Henderson J.M., Kutner M.H. Endotoxin in portal, hepatic and peripheral blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:232-36.
204. Lumsden A.B., Henderson M., Alspaugh J. Endotoxemia during percutaneous manipulation of the obstructed biliary tree. *Am J Surg* 1989;158:21-4.
205. Macho J.R. Pathophysiologic significance of bacterial translocation. en: Debas H.T. *Gastrointestinal Disease*. New Orleans: American College of Surgeons; 1992:12-3.
206. Maddaus M.A., Wells C.L., Platt J.C., Condie R.M., Simmons R.L. Effect of T-cell modulation of the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann Surg* 1988;207:387-98.

207. Makishima T., Saito H., Morioka Y. The effect of immunological response on wound healing in rat with liver cirrhosis. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):147.
208. Malangoni M.A., Livingston D.H., Sonnenfeld G., Polk H.C. Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha: Use in gram-negative infection after shock. *Arch Surg* 1990;125:444-6.
209. Malchow-Moller A., Thomsen C., Hilden J., Matzen P., Mindeholm L., Juhl E. The Copenhagen computer icterus group: survival after jaundice: a prospective study of 1000 cases. *Scand J Gastroenterol* 1985;20:155.
210. Manganaro M., Parravani R., Cosimati F., Frezza G. Action of a bovine thymic extract (TP-1) on MHV-3. Experimental hepatitis in the mouse. *Arzneimittelforschung* 1981;31:1263-5.
211. Mannel D.N. Possible role of endotoxin in mediating host resistance. *Klin Wochenschr* 1982;60:752-3.
212. Mannick J.A. The interleukins, interferon-gamma, and immune function. In: Demling R.H. *Surgical basic science: cytokines/growth factors: basic concepts in clinical relevance*. Postgraduate course. American College of Surgeons. New Orleans, 1992:13-14.
213. Margaretten W., McKay D.G. Thrombotic ulcerations of the gastrointestinal tract. *Arch Intern Med* 1971;127:250-3.
214. Marijuán Martín J.L., Mirás-Estacio M., Larrañaga E., Barrera E., de Areba Leblíc M.D., Gallego J.L. et al. Resultados de la profilaxis con timoestimulina en la prevención de la sepsis postquirúrgica. *Cir Esp* 1988;48:3-7.
215. Marshall J.C., Christou N.V., Meakins J.L. The gastrointestinal tract: the "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 1993;218:111-9.
216. Marshall J.C., Lee C., Meakins J.L., Michel R.P., Christou N.V. Kupffer cell modulation of the systemic immune response. *Arch Surg* 1987;122:191-6.
217. Mathie R.T., Nagorney D.M., Blumgart L.H. Liver blood flow: physiology, measurement and clinical relevance. 1. en: Blumgart L.H. *Surgery of the liver and biliary tract*. New York: Churchill Livingstone; 1988:73-87.

218. Mathison J.C., Ulevitch R.J. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* 1979;123:2133-43.
219. Mc Cuskey R.S., Urbaschek R., Mc Cuskey P.A. In vivo microscopic studies of the responses of the liver to endotoxin. *Klin Wochensh* 1982;60:749-51.
220. McGhee J.R., Kiyono H., Alley C.D. Gut bacterial endotoxin: influence on gut-associated lymphoreticular tissue and host immune function. *Surv Immunol Res* 1984;3:241-52.
221. Meakins J.L., Hohn D.C., Simmons R.L., Dunn D.L., Hunt T.K., Knighton D.R. Defensas del huésped. en: Howard R.J., Simmons R.L. Tratado de infecciones en cirugía. Mexico D.F.: Nueva Editorial Interamericana; 1991:163-213.
222. Megison S.M., Dunn C.W., Horton J.W., Chao H. Immunologic recovery after biliary drainage in obstructive jaundice. *Curr Surg* 1989;46:383-5.
223. Menconi E., Barzi A., Bonmassar E., Pucetti P. Effect of a calf thymic extract (TP-1) on the generation of cell mediated cytotoxicity in vitro. en: Aiuti F., Wizgell H. Thymus, thymic hormones and T-lymphocytes. New York: Academic Press; 1980:219-27.
224. Meroño E.A. Acción de la timoestimulina en el curso evolutivo de la peritonitis experimental en la rata. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Enero, 1992.
225. Mestecky J, Russell M.W., Jackson S., Brown T.A. The human IgA: a reassessment. *Clin Immunol Immunopat* 1986;40:105-114.
226. Michie H.R., Manogue K.R., Spriggs D.R., Revhaug A., O'Dwyer S., Diarello C.A. et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318:1481-6.
227. Michie H.R., Spiggs D.R., Manogue K.R. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988;104:280-6.
228. Michie H., Wilmore D.W. Sepsis and tumor necrosis factor-bedfellows that cannot be ignored. *Ann Surg* 1990;211:653-4.

229. Michie H.R., Wilmore D.W. Sepsis, signals, and surgical sequelae (a hypothesis). *Arch Surg* 1990;125:531-6.
230. Mileski W.J. Sepsis: What it is and how to recognize it. *Surg Clin North Am* 1991;71:749-63.
231. Minuk G.Y., Rascanin N., Sarjeant E.S., Pai C.H. Sepsis and cholestasis: the in vitro effects of bacterial products on ¹⁴C-taurocholate uptake by isolated rat hepatocytes. *Liver* 1986;6:199-204.
232. Miyata T., Todo S., Inventarza O., Ueda Y., Furukawa H., Starzl T.E. Endogenous endotoxemia during orthotopic liver transplantation in dogs. *Transplant Proc* 1989;21:3861-2.
233. Miyata T., Todo S., Selby R., Yokoyama I., Tzakis A., Starzl T.E. Endotoxaemia, pulmonary complications, and thrombocytopenia in liver transplantation. *Lancet* 1989:189-91.
234. Mochida S., Ogata I., Hirata K., Ohta Y., Yamada S., Fujiwara K. Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 1990;99:771-7.
235. Mori K., Matsumoto K., Gans H. On the in vivo clearance and detoxification of endotoxin by lung and liver. *Ann Surg* 1973;177:159-63.
236. Morrison D.C., Ryan J.L. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979;28:293-450.
237. Morrison D.C., Ryan J.L. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987;38:417-32.
238. Morrison D.C., Ulevitch J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol* 1978;93:527-617.
239. Munford R.S. Endotoxin(s) and the liver. *Gastroenterology* 1978;75:532-5.
240. Munthe-Kass A.C., Kaplan G., Seljelid R. On the mechanism of internalization of opsonized particles by rat Kupffer cells in vitro. *Exp Cell Res* 1976;103:201-12.
241. Nagy S.U., Bertok L. Influence of experimentally induced endotoxemias on the thyroid function of rats. *Acta Physiol Hung* 1990;76:137-41.

242. Navaratnam R.L., Morris S.E., Traber D.L., Flynn J., Woodson L., Linares H. et al. Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT). *J Trauma* 1990;30:1104-13.
243. Navarro M., Salinas J.C., Sanz P., Morandeira M.J., Revilla J.M., Morandeira J.R. et al. Modelo experimental para medir la depresión de la respuesta inmune inducida por distintos tipos de cirugía. *Cir Esp* 1987;2:254-59.
244. Newberry W.M., Shorey J.W., Sanford J.P., Combes B. Depression of lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver disease. *Cell Immunol* 1973;6:87-97.
245. Ninnemann J.L., Stockland A.E., Condie J.T. Induction of prostaglandin synthesis-dependent suppressor cells with endotoxin: occurrence in patients with thermal injuries. *J Clin Immunol* 1983;3:142-50.
246. Ninnemann J.L., Stockland A.E., Condie J.T. Induction of prostaglandin synthesis-dependant suppressor cells with endotoxin: occurrence in patients with termal injuries. *J Clin Immunol* 1984;3:142-50.
247. Nolan J.P. The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 1975;69:1346-56.
248. Nolan J.P. Spontaneous endotoxinaemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:7-8.
249. Nolan J.P., Camara D.S. Endotoxin, sinusoidal cells, and liver injury. *Prog Liver Dis* 1982;7:361-376.
250. Nolan J.P., Hare D.K, McDevitt J.J., Ali V. In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 1977;72:434-9.
251. Nolan J.P., O'Connell C.J. Vascular response in the isolated rat liver. I. Endotoxin, direct effects. *J Exp Med* 1962;116:433-50.
252. Nolan J.P. CD S. The importance of intestinal endotoxins in liver disease. *Prog Clin Biol Res* 1985;189:347-67.
253. Norman S.J. Kinetics of phagocytosis II: analysis of in vivo clearance with de-

- monstration of competitive inhibition between similar and dissimilar foreign particles. *Lab Invest* 1974;31:161-73.
254. Normann S.J. Kinetics of phagocytosis III. Two colloid reactions, competitive inhibition, and degree of inhibition between similar and dissimilar foreign particles. *Lab Invest* 1974;31:286-93.
255. Nossal G. The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 1987;316:1320-5.
256. Novitsky T. Elección racional de un método para el ensayo del LAL. *Real Farmacopea Española* (Ministerio de Sanidad y Consumo), junio 1992.
257. Nowotny A. Review of the molecular requirements of endotoxic actions. *Rev Infect Dis* 1987;9:S503-11.
258. Noyes H.E., McInturf C.R., Blahuta G.F. Studies on distribution of *Escherichia Coli* endotoxin in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;100:65-8.
259. O'Connor M.J. Mechanical biliary obstruction: a review of the multisystem consequences of obstructive jaundice and their impact on perioperative morbidity and mortality. *Am Surg* 1985;51:245-51.
260. O'Dwyer S.T., Michie H.R., Ziegler T.R. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy human. *Arch Surg* 1988;123:1459-64.
261. Oettinger W., Berger D., Beger H.G. Klinische Relevanz von Endotoxin und Eicosanoiden bei schwerer Sepsis. en: Reinhart K., Eyrich K. *Sepsis: eine interdisziplinäre Herausforderung*. Berlin: Springer Verlag; 1989:329-38.
262. Offenbartl K., Bengmark S. Intraabdominal infections and gut origin sepsis. *World J Surg* 1990;14:191-5.
263. Ohshio G., Manabe T., Tobe T., Yoshioka H., Hamashima Y. Circulating immune complex, endotoxin, and biliary infection in patients with biliary obstruction. *Am J Surg* 1988;155:343-7.
264. Olcay I., Kitahama A., Miller R., Drapanas T., Trejo R., Di Luzio N.R. Reticulo-endothelial dysfunction and endotoxemia following portal vein occlusion. *Surgery* 1974;75:64-70.

265. Old L.J. Tumor necrosis factor. Another chapter in the long history of endotoxin. *Nature* 1987;330:602-3.
266. Olofsson P., Nylander G., Olsson P. Endotoxin-transport routes and kinetics in intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1985;151:635-9.
267. Olofsson P., Nylander G., Olsson P. Endotoxin: routes of transport in experimental peritonitis. *Am J Surg* 1986;151:443-6.
268. Owens W.E., Berg R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of atyhmic (nu/nn) mice. *Infect Immun* 1980;27:461-7.
269. Pain C.A., Cahill C.J., Bailey M.E. Perioperative complications in obstructive jaundice: therapeutic considerations. *Br J Surg* 1985;75:942-945.
270. Pain J.A. BM E. Experimental and clinical study of lactulose in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1986;73:775-8.
271. Pain J.A. BM E. Measurement of operative plasma endotoxin levels in jaundiced and non-jaundiced patients. *Eur Surg Res* 1987;19:207-16.
272. Pain J.A. BM E. Prevention of endotoxaemia in obstructive jaundice-a comparative study of bile salts. *HPB Surg* 1988;1:21-27.
273. Pain J.A. CC J., Bailey M.E. Perioperative complications in obstructive jaundice: therapeutical considerations. *Br J Surg* 1986;72:942-945.
274. Pain J.A. CC, Gilbert J., Trapnell J., Bailey M. Postoperative renal function in obstructive jaundice- a prospective randomised study. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):216.
275. Papa M., Halperin Z., Rubinstein E., Orenstein A., Gafin S., Adar S. The effect of ischemia of the dog's colon on transmural migration of bacteria and endotoxin. *J Surg Res* 1983;35:264-9.
276. Papa M. HZ, Rubinstein E. The effect of ischemia of the dog's colon on transmural migration of bacteria and endotoxin. *J Surg Res* 1983;35:264-9.
277. Parrillo J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;328:1471/7.
278. Pellegrini C. Pathophysiology of biliary obstruction. en: Way P. *Surgery of the gallbladder and bile ducts*. Philadelphia: WP. Saunders; 1987:103-17.

279. Percy-Robb I.W., Collee J.G. Bile acids: A pH dependent antibacterial system in the gut? *Br Med J* 1972;3:813-5.
280. Phillips S.F., Quigley E.A.A., Kumar D.M., Kamath P.S. Motility of the ileocolonic junction. *Gut* 1988;29:390-406.
281. Pinto M., Kaplun A. Immune status in mice with experimental biliary obstruction. *Clin Immunol Immunopathol* 1980;16:396.
282. Pitt H.A., Cameron J.L., Postier R.G., Gadacz T.R. Factors affecting mortality in biliary tract surgery. *Am J Surg* 1981;141:66-71.
283. Popp M.B., Brennan M.F. Long term vascular access in the rat: importance of asepsis. *Am J Physiol* 1981;241:H-606.
284. Posner M.C., Burt M.E., Stone H.D., Han B.L., Warren R.S., Vydellingum N.A. et al. A model of reversible obstructive jaundice in the rat. *J Surg Res* 1990;48:204-10.
285. Praaning van Daalen D.P., Brouwer A., Knock D.L. Clearance capacity of rat liver Kupffer, Endothelial and Parenchymal cells. *Gastroenterology* 1981;81:1036-44.
286. Prytz H., Holst-Christensen J., Korner B., Liehr H. Portal venous and systemic endotoxaemia in patients without liver disease and systemic endotoxaemia in patients with cirrosis. *Scand J Gastroenterol* 1976;11:857-63.
287. Purandare S., Offenbartl K., Westrom B., Bengmark S. Increased gut permeability to fluorescein isothiocyanate-dextran after total parenteral nutrition in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:678-82.
288. Putzki H., Reichert B. The serum activities of AP, gamma-GT, GLDH and GPT after bile duct obstruction and ethionine in the rat. *Gastroenterol J* 1990;50:50-2.
289. Ramadori G., Meyer zum Buschenfelde K.H. Hepatic uptake of endotoxin. *Gastroenterology* 1982;83:521-2.
290. Raper S.E., Barker M.E., Jones A.L., Way L.W. Anatomic correlates of bacterial cholangiovenous reflux. *Surgery* 1989;105:352-9.
291. Redan J.A., Rush B.F., McCullough J.N., Machiedo G.W., Murphy T.F., Dikdan

- G.S. et al. Organ distribution of radiolabeled enteric E.Coli during and after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1990;211:663-8.
292. Redan J.A. RB F., Lysz T.W., Smith S., Machiedo G.W. Organ distribution of gut-derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia. *Am J Surg* 1990;159:85-90.
293. Redmond H.P., Chavin K.D., Bromberg J.S., Daly J.M. Inhibition of macrophage-activating cytokines is beneficial in the acute septic response. *Ann Surg* 1991;214:502-9.
294. Revhaug A., Michie H.R., Manson J.M., Watters J.M., Dinarello C.A., Wolff S.M. et al. Inhibition of cyclo-oxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans. *Arch Surg* 1988;123:162-70.
295. Ribeiro V., Northfield T.C., Knight M. Biliary acids and renal function in jaundiced patients. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):215.
296. Ribi E., Anacker R.L., Brown R. Reaction of endotoxin and surfactants: 1. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J Bacteriol* 1966;92:1493-1509.
297. Richards P.S., Saba T.M. Effect of endotoxin on fibronectin and Kupffer cell activity. *Hepatology* 1985;5:32-7.
298. Rietschel E.T., Brade L., Schade F.U., Seydel U., Zaeringer U., Mamat U. et al. Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. *Immun Infekt* 1993;21:26-35.
299. Rietschel E.T., Brade H. Endotoxinas bacterianas. *Invest Ciencia* 1992;193:16-24.
300. Rietschel E.T., Brade H. Lipopolysaccharide, die Endotoxine und O-Antigene gramnegativer Bakterien: Chemische Struktur, biologische Wirkung und serologische Eigenschaften. *Infection* 1987;15:S76-84.
301. Rietschel E.T., Schade U., Jensen M., Wollenweber H.W., Luderitz O., Greisman S.G. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. *Scand J Infect Dis Suppl* 1982;31:8-21.
302. Rola-Pleszczynski M., Hensen S.A., Vincent M.M., Belianti J.A. Inhibitory effects of bilirubin on cellular immune responses in man. *J Pediatr* 1975;86:690-6.

303. Roscher R., Oettinger W., Beger H.G. Bacterial microflora, endogenous endotoxin, and prostaglandins in small bowel obstruction. *Am J Surg* 1988;155:348-55.
304. Rosoff C.B., Goldman H. Effect of the intestinal bacterial flora on acute gastric stress ulceration. *Gastroenterology* 1968;55:212-22.
305. Roughneen P.T., Didlake R., Kumar S.C., Kahan B.D., Rowlands B.J. Enhancement of heterotopic cardiac allograft survival by experimental biliary ligation. *Transplantation* 1987;43:437-8.
306. Roughneen P.T., Didlake R., Kumar S.C., Kahan B.D., Rowlands B.J. The protective effect of hepatic dysfunction on vascularized allograft survival. *J Surg Res* 1987;42:447-53.
307. Roughneen P.T., Drath K.B., Kulkarni A.D., Rowlands B.J. Extrahepatic cholestasis alters neutrophilic and tissue macrophage phagocytic and metabolic activity. *Surg Forum* 1986;37:148-50.
308. Roughneen P.T., Drath D.B., Kulkarni A.D., Rowlands B.J. Impaired nonspecific cellular immunity in experimental cholestasis. *Ann Surg* 1987;206:578-82.
309. Roughneen P.T., Gouma D.J., Kulkarni A.D., Fanslow W.F., Rowlands B.J. Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J Surg Res* 1986;41:113-25.
310. Roughneen P.T., Kulkarni A.D., Gouma D.J., Fanslow W.C., Rowlands B.J. Suppression of host-versus-graft response in experimental biliary obstruction. *Transplantation* 1986;42:687-9.
311. Roughneen P.T., Kumar S.C., Pellis N.R., Rowlands B.J. Endotoxemia and cholestasis. *Surg Gynecol Obstet* 1988;167:205-10.
312. Rowlands B.J., Hoper M., Ranjbar S., McCluskey D., Thompson R. T lymphocyte function in obstructive jaundice and following biliary drainage: Comparison of animal model and patients. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):208.
313. Rubaltelli F.F., Granati B., Fortunato A. Inhibitory effects of bilirubin and photobilirubin on neonatal and adult T-lymphocytes and granulocytes. *Biol Neonate* 1982;42:152-8.

314. Rudbach J.A., Anacker R.L., Haskins W.T. Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin. *Ann N Y Acad Sci* 1966;133:629-43.
315. Ryan J.L., Glode L.M., Rosenstreich D.L. Lack of responsiveness of C3H/HeJ macrophages to lipopolysaccharide: the cellular basis of LPS-stimulated metabolism. *J Immunol* 1979;122:932.
316. Saba T.M. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med* 1970;126:1031-52.
317. Schaffner F., Bacchin P.G., Hutterer F. Mechanisms of cholestasis: structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1971;60:888-97.
318. Scharschmidt B.F., Schmid R. Bile secretion, intestinal lipid absorption, and the enterohepatic circulation of bile salts. en: Way P. *Surgery of the gallbladder and bile ducts*. Philadelphia: WP. Saunders; 1987:23-50.
319. Scharschmidt B.F., Way L.W. The jaundiced patient: differential diagnosis and clinical approach. En: Way P. *Surgery of the gallbladder and bile ducts*. Philadelphia: WP. Saunders; 1987:215-30.
320. Schneierson S.S., Amsterdam D., Perlman E. Enhancement of intraperitoneal staphylococcal virulence for mice with different bile salts. *Nature* 1961;190:829-30.
321. Schuette A.H., Huttemeier P.C., Hill R.D., Watkins W.D., Wonders T.R., Kong D. et al. Regional blood flow and pulmonary thromboxane release after sublethal endotoxin infusion in sheep. *Surgery* 1984;95:444-53.
322. Schütt C., Schumann R. Der Endotoxinrezeptor CD 14. *Immun Infekt* 1993;21:36-40.
323. Scott-Conner C.E.H., Grogan J.B., Scher K.S., Bernstein J. Impaired clearance of *Escherichia Coli* bacteriemia in early biliary obstruction. *Am J Surg* 1989;157:210-14.
324. Scriven M.W., Thomas M.A., Puntis M.C. Changes in bilirubin and bile salts after the relief of obstructive jaundice. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):213.
325. Scriven M.W., Thomas M.A., Manku M.S., Stewart J.C., Horrobin D.F., Puntis

- M.C. Essential fatty acid metabolism is abnormal in obstructive jaundice. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):211.
326. Semeraro N., Montemurro P., Chetta G., Altomare D.F., Giordano D., Colucci M. Increased procoagulant activity of peripheral blood monocytes in human and experimental obstructive jaundice. *Gastroenterology* 1989;96:892-8.
327. Shands J.W. Jr., Chun P.W. The dispersion of gram negative lipopolysaccharide by deoxicholate. *J Biol Chem* 1980;255:1221-5.
328. Shirai M., Yoshimura A., Nishioka M., Shiga J., Mori W., Fukuda I. et al. Organ distribution of ³H-endotoxin in rats with liver fibrosis and rats with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1989;36:172-4.
329. Shoham J., Cohen M., Chandali Y., Avni A. Thymic hormonal activity on human peripheral blood lymphocytes, in vitro. I. Reciprocal effect on T and B rosette formation. *Immunology* 1980;41:353-9.
330. Shoham J., Eshel I., Aboud M., Salzberg S. Thymic hormonal activity on human peripheral blood lymphocytes in vitro. II. Enhancement of the production of immune interferon by activated cells. *J Immunol* 1980;125:54-8.
331. Singh S., Bailey M.E. Bile salts alter isolated Kupffer cell morphology without loss of viability. *HPB Surg* 1990;2(Suppl):297.
332. Sitges-Serra A., Carulla X., Piera C., Martínez-Ródenas F., Franch G., Pereira J. et al. Body water compartments in patients with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1992;79:553-6.
333. Sommers H.M. Microflora normal en el ser humano. en: Howard R.J., Simmons R.L. *Tratado de infecciones en cirugía*. Mexico D.F.: Nueva Editorial Interamericana; 1991:15-23.
334. Sori A.J., Rush B.F., Lysz T.W., Smith S., Machiedo G.W. The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *Am J Surg* 1988;155:187-92.
335. Souba W.W., Herskowitz K., Klimberg V.S., Salloum R.M., Plumley D.A., Flynn T.C. et al. The effect of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg* 1990;211:543-50.

336. Spaeth G., Berg R.D., Specian R.D., Deitch E.A. Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1990;108:240-7.
337. Spaeth G., Specian R.D., Berg R.D., Deitch E.A. Splenectomy influences endotoxin-induced bacterial translocation. *J Trauma* 1990;30:1267-72.
338. Srecjar J., Miler I., Pekarek J. Effect of bilirubin on an in vitro correlate of cell-mediated immunity: the migration inhibition test. *J Clin Lab Immunol* 1984;13:145-9.
339. St Georgiev V. Immunomodulatory activity of small peptides. *TIPS* 1990;11:373-8.
340. Stahl T.J., Cerra F.B. Respuestas hemodinámica y metabólica. en: Howard R.J., Simmons R.L. *Tratado de infecciones en cirugía*. Mexico D.F.: Nueva Editorial Interamericana; 1991:225-50.
341. Starnes H.F., Conti P.S., Warren R.S., Jeevanandam M., Brennan M.F. Altered peripheral amino acid uptake in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1987;42:383.
342. Starzl T.E., Demetris A.J. Liver transplantation: A 31 year perspective. Part II. *Curr Prob Surg* 1990;27:129-36.
343. Steffan A.M., Kirn A. C3-mediated phagocytosis induced in murine Kupffer cells by in vitro activation with endotoxin. *Gastroenterol Clin Biol* 1986;10:117-21.
344. Stein T.A., Burns G.P., Wise L. Diagnostic value of liver function tests in bile duct obstruction. *J Surg Res* 1989;46:226-9.
345. Sultzer B.M., Bandekar J.R., Castagna R., Abu-Lawi K., Sadeghian M., Norin A.J. Suppression of C3H/HEJ cell activation by lipopolysaccharide endotoxin. *Infect Immun* 1992;60(9):3533-8.
346. Svecjar J., Miler I., Pekarek J. Effect of bilirubin on an in vitro correlate of cell-mediated immunity-the migration inhibition test. *J Clin Lab Immunol* 1984;13:145-9.
347. Szein M.B., Goldstein A.L. Thymic hormones - A clinical update. *Springer Semin Immunopathol* 1986;9:1-18.

348. Tanaka N., Ryden S., Bergqvist L., Christensen P., Bengmark S. Reticulo-endothelial function in rats with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1985;72:946-9.
349. Tarao K., Moroi T., Nagakura Y., Ikeuchi T., Suyama T., Endo O. et al. Relationship between endotoxaemia and protein concentration of ascites in cirrhotic patients. *Gut* 1979;20:205-10.
350. Tarao K., So K., Moroi T., Ikeuchi T., Suyama T., Endo O. et al. Detection of endotoxin in plasma and ascitic fluid of patients with cirrhosis: its clinical significance. *Gastroenterology* 1977;73:539-42.
351. Thompson J.N., Rotoli B. Endotoxins, the liver and haemostasis. In Blumgart L.H. (ed.). *Surgery of the liver and biliary tract*. Churchill Livingstone, 133-148, 1988.
352. Thompson J.N., Cohen J., Moore R.J., Blenkharn J.I., McConnell J.S., Matkin J. et al. Endotoxemia in obstructive jaundice: Observations on cause and clinical significance. *Am J Surg* 1988;155:314-21.
353. Thompson J.N., Cohen J., Blenkharn J. Randomised clinical trial of ursodeoxycolic acid in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1986;73:634-6.
354. Tovo P.A., Nicola P. Thymostimulin therapy in patients with secondary immunodeficiencies. in: Aiuti F., Wizgell H. *Thymus, Thymic Hormones and T Lymphocytes*. New York: Academic Press; 1980:307-311.
355. Tracey K.J., Vlassara H., Cerami A. Peptide regulatory factors: cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1989;:1122-6.
356. Trede M., Schwall G. The complications of pancreatectomy. *Ann Surg* 1988;207:39-47.
357. Triger D.R., Alp M.H., Wright R. Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* 1972;:60-3.
358. Triger D.R., Boyer T.D., Levin J. Portal and systemic bacteriemia and endotoxaemia in liver disease. *Gut* 1978;19:935-9.
359. Turunen U., Malkamäki M., Valtonen V., Larinkari U., Pikkarainen P., Salaspuro M.P. et al. Endotoxin and liver diseases: high titers of enterobacterial common antigen antibodies in patients with alcoholic cirrhosis. *Gut* 1981;22:849-53.

360. Uchino R., Saitoh N., Hiraoka T., Miyauchi Y. Effect of activated protein C on impaired fibrinolysis in rats with obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 1992;24:298-301.
361. Unanue E.R. The regulation of lymphocytic function by the macrophage. *Immunol Rev* 1978;40:227.
362. Urbaschek B., Ditter B., Urbaschek R. The significance of the penetration of endotoxin from the intestinal tract. *Prog Clin Biol Res* 1982;93:381-4.
363. van Deventer S.J., ten Cate J.W., Tytgat G.N. Intestinal endotoxemia. Clinical significance. *Gastroenterology* 1988;94:825-31.
364. van Leeuwen P., Hong R., Rounds J., Rodrick M., Wilmore D. Hepatic failure and coma after liver resection is reversed by manipulation of gut contents: the role of endotoxin. *Surgery* 1991;110:169-75.
365. Vane D.W., Redlich P., Weber T., Clapman S., Siddiqui A.R., Grosfeld J.L. Impaired immune function in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1988;45:287-93.
366. Vidal C., González A., Uriarte P., Cuervas-Mons V. Estructura y función de las células de Kupffer. *Dolor & Inflamación*: 1991; 4:315-326.
367. Visner M.S., Cerra F.B., Anderson R.W. Hemodynamic and metabolic responses. en: Simmons R.L., Howard R.J. *Surgical infectious diseases*. New York: Appleton Century Crofts; 1982:329-32.
368. Wait R.B., Kahng K.U. Renal failure complicating obstructive jaundice. *Am J Surg* 1989;157:256-63.
369. Walker R.I., Porvaznik M.J. Disruption of the permeability barrier (zonula occludens) between intestinal epithelial cells by lethal doses of endotoxin. *Infection and Immunity* 1978;21:655-8.
370. Walters M.A., Gerarde H.W. An ultramicromethod for the determination of conjugated and total bilirubin in serum or plasma. *Microchem J* 1970;15:231-43.
371. Wang S., Geller D., Lu G., Wan Y., Shapiro R., Tweardy D. et al. Regulation of lipopolysaccharide binding protein gene transcription in rat hepatocytes. *Proceedings 48 th Annual Sessions of the Forum on Fundamental Surgical Problems* 1992;:169-171.

372. Wardle E.N. Endotoxin and acute renal failure. *Nephron* 1975;14:321-32.
373. Wardle E.N. Endotoxaemia and the pathogenesis of acute renal failure. *Q J Med* 1975;44:389-98.
374. Wardle E.N., Wright N.A. Endotoxin and acute renal failure in obstructive jaundice. *Br Med J* 1970;4:472-4.
375. Warren R.S., Molt P., Paidas C.N., Jeevanandam M., Brennan M.F. Impaired metabolic response to endotoxin in obstructive jaundice. *Surgery* 1986;100:349-55.
376. Wells C.L., Maddaus M.A., Simmons R.L. Proposed mechanism for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-979.
377. Wells C.L. MM A., Simmons R.L. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 1987;122:48-53.
378. Wells G.R. TE W., Lindsay G., Morton L. Relationship between bile colonization, high risk factors and postoperative sepsis in patients undergoing biliary tract operations while receiving a prophylactic antibiotic. *Br J Surg* 1989;76:374-77.
379. Werner G.H. Natural and synthetic peptides (other than neuropeptides) endowed with immunomodulating activities. *Immunol Lett* 1987;16:363-70.
380. Weser E., Bell D., Tawil T. Effects of octapeptide-cholecystokinin, secretin, and glucagon on intestinal mucosal growth in parenterally nourished rats. *Dig Dis Sci* 1981;26:409-16.
381. Wiesner R.H., Hermans P.E., Rakela J., Washington II J.A., Perkins J.D., Di-Cecco S. et al. Selective bowel decontamination to decrease gram-negative aerobic bacterial and candida colonization and prevent infection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1988;45:570-4.
382. Wilkinson S.P., Arroyo V., Gazzard B.G., Moodie H., Williams R. Relation of renal impairment and hemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1974;1:521-4.
383. Wilkinson S.P., Moodie H., Stamatakis J.D., Kakkar V.V., Williams R. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 1976;1:1415-8.
384. Wiznitzer T., Schweinberg F.B., Atkins N. On the relation of the size of the in-

- traintestinal pool of endotoxin to the development of irreversibility in hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1960;112:1167-79.
385. Yokoyama I., Todo S., Selby R., Tzakis A.G., Starzl T.E. Endotoxemia and human liver transplantation. *Transplant Proc* 1989;21:3833-41.
386. Yurt R.W., Lowry S.F. Role of the macrophage and endogenous mediators in multiple organ failure. en: Deitch E.A. Multiple organ failure: Pathophysiology and basic concepts of therapy. New York: Georg Thieme Verlag; 1990:60-71.
387. Zabel P., Schade F.U. Therapiestrategien gegen Mediatoren beim septischen Schock. *Immun Infekt* 1993;21:45-50.
388. Zhou W., Chao W., Levine B.A., Olson M.S. Role of platelet-activating factor in hepatic responses after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol* 1992;263:G587-92.

